

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Elementos de captura génica en ambientes
naturales: Integrone**

Tesis Doctoral

Leonor Garmendía Jorge

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Elementos de captura génica en ambientes
naturales: Integrines**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

Leonor Garmendía Jorge

Director: Dr. José Luis Martínez Menéndez

Tutor: Dr. Fernando Rojo de Castro

A mis padres y hermano

A mi abuela

A Jesús

Agradecimientos

Al Dr. José Luis Martínez, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio, por haber confiado en mí en aquella entrevista hace ya varios años. Muchas gracias por haberme apoyado en aspectos personales, por tu rápida revisión, por tu dirección y trabajo en estos años.

Al Dr. Fernando Rojo, por haber sido mi tutor. Gracias por todo el papeleo, por tu atención y comentarios en los seminarios.

Al personal técnico y administrativo del Centro Nacional de Biotecnología por estar siempre dispuestos a ayudarte solventando problemas de papeleo, dudas, firmas, requisitos, etc.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal. A Rosa del Campo, por haberme ayudado tanto en esta tesis y por todas las colaboraciones que nos quedan.

Al Grupo de Genética Evolutiva del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de Valencia, en especial a Miguel Pignatelli y Javier Tamames, por abrirme ese mundo desconocido que es la bioinformática, gracias por la preocupación y ayuda brindada.

A Manuel Ferrer y su grupo de trabajo, por haberme cedido las muestras de los ambientes extremos, por toda la ayuda ofrecida.

A mis compañeros de laboratorio 212 y 216.

ÍNDICE

Índice

Summary	17
Abreviaturas.....	21
1. Introducción.....	25
1.1. Transferencia horizontal de genes: elementos genéticos	26
1.2. Integrones	30
1.2.1. Definición y estructura	31
1.2.2. Clasificación	34
1.2.3. Cassetes génicos: estructura y función.....	36
1.2.4. Superintegrones	39
1.3. Ecosistemas naturales como origen de la resistencia a los antibióticos	41
1.4. Diversidad bacteriana: Metagenomas	43
2. Objetivos	49
3. Materiales y Métodos	53
3.1. Muestras medioambientales	53
3.2. Aislamiento de DNA.....	55
3.3. Pre-amplificación del DNA	55
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	56
3.5. Ligación y transformación	58
3.6. Aislamiento de plásmidos y secuenciación.....	59
3.7. PCR en tiempo real	59
3.8. Análisis bioinformático	60
3.8.1. Análisis de secuencias obtenidas en los diferentes ambientes analizados en el estudio	60
3.8.2. Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de genomas parciales y completos de bacterias.....	60
3.8.3. Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de metagenomas.....	61
3.8.4. Búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas....	61
3.8.5. Búsqueda del gen <i>aadA</i> en bases de datos de metagenomas y en bacterias no cultivadas	61

3.8.6.	Creación de una base de secuencias de integrasas, de sitios <i>attC</i> y programas accesorios para el análisis bioinformático.....	62
3.9.	Búsqueda de genes de resistencia en genotecas procedentes de ambientes extremos.....	63
3.9.1.	Descripción de las genotecas	63
3.9.2.	Amplificación de las genotecas.....	64
3.9.3.	Selección de clones resistentes a antibióticos y biocidas.....	65
3.9.4.	Determinación de la CMI para los clones seleccionados	66
3.9.5.	Comprobación del fenotipo de resistencia	67
3.9.5.1.	<i>Extracción de fósidos</i>	67
3.9.5.2.	<i>Confirmación del fenotipo de resistencia</i>	67
3.9.5.3.	<i>Fenotipo de resistencia-sensibilidad</i>	67
3.9.5.4.	<i>Secuenciación de los fósidos</i>	69
4.	Resultados	73
4.1.	Aislamiento del DNA total en muestras ambientales y pre-amplificación	73
4.2.	Amplificación de integrasas y regiones centrales tipo 1 en muestras procedentes de ambientes naturales	74
4.2.1.	Integrasas tipo 1 en ambientes naturales contaminados y no contaminados	74
4.2.2.	Regiones centrales tipo 1 en ambientes naturales contaminados y no contaminados.....	77
4.2.3.	Integrasas y regiones centrales tipo 1 en un ambiente extremo: Urania.....	86
4.3.	Análisis de las muestras procedentes del intestino humano.....	94
4.4.	Análisis global de los resultados obtenidos para las integrasas y las regiones centrales de los integrones tipo 1 en los distintos ambientes estudiados	96
4.5.	Cuantificación de integrasas tipo 1 en ambientes contaminados y no contaminados mediante PCR en tiempo real	98
4.6.	Análisis bioinformático	101
4.6.1.	Búsqueda de integrones en bases de datos de genomas completos y parciales (WGS) de bacterias ya secuenciadas ..	101
4.6.2.	Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de metagenomas.....	108
4.6.2.1.	<i>Búsqueda en la base de metagenomas MG-RAST...</i>	108
4.6.2.2.	<i>Búsqueda en la base de metagenomas CAMERA</i>	111
4.6.2.3.	<i>Búsqueda en la base de metagenomas IMG/M.....</i>	113

4.6.2.4.	Búsqueda en las bases de metagenomas GOLD y NCBI	117
4.6.3.	Búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas..	117
4.6.4.	Búsqueda del gen <i>aadA1</i> en bases de metagenomas y en bacterias no cultivadas	120
4.6.5.	Creación de una base de secuencias de integrasas, de sitios <i>attC</i> y programas accesorios para el análisis.....	122
4.7.	Búsqueda de genes de resistencia en ambientes extremos	132
4.7.1.	Determinación de la CMI a antibióticos y biocidas en la cepa de <i>E. coli</i> EPI300	132
4.7.2.	Selección de clones resistentes a antibióticos y biocidas y determinación de la CMI	132
4.7.3.	Comprobación del fenotipo de resistencia	136
4.7.4.	Secuenciación de los fósidos.....	140
5.	Discusión	147
5.1.	Integrasas y regiones centrales en ambientes contaminados y no contaminados	147
5.2.	Integrasas y regiones centrales en un ambiente aislado de la actividad humana, la fosa Urania	152
5.3.	Análisis del ambiente clínico, muestras procedentes del intestino humano.....	154
5.4.	Cuantificación de las integrasas en diferentes ambientes	156
5.5.	Integrones en bases de datos de genomas y metagenomas....	157
5.6.	Genes de resistencia a antibióticos y biocidas en ambientes naturales extremos.....	160
6.	Conclusiones.....	165
7.	Bibliografía.....	169
8.	Índice de tablas	187
9.	Índice de figuras.....	193
10.	Anexo I	199
11.	Anexo II: Artículos publicados.....	207

RESUMEN

Summary

The acquisition of elements that contribute to the propagation of antibiotic resistance genes such as plasmids, bacteriophages, integrative conjugative elements, transposons, IS elements or genomic islands by Horizontal Gene Transfer (HGT), increases genetic diversity (de la Cruz and Davies 2000) and contribute, in many cases, to bacterial evolution and adaptability to the environment (Michael *et al.* 2004). Integrons are gene capture elements that contain the elements necessary for incorporating, by a recombination event mediated by an integrase, foreign DNA (gene cassettes) at specific recombination sites (*attI*) and their expression through a promoter (*P_c*) (Mazel 2006). They possess two conserved regions separated by a variable region containing one or more genes integrated as cassettes (Stokes *et al.* 2001). The best studied integrons are those responsible for antibiotic resistance in human pathogens but antibiotics resistance genes are not only restricted to clinical environments, in fact, the origin of these genes is in environmental microorganisms. We also know that pollution produces changes in the biosphere, including the microbiota, and might modify, due to its selective pressure, the prevalence and activity of elements involved in HGT. In this thesis, we investigate, the presence of integrons in natural nonclinical contaminated ecosystems, uncontaminated, away from human activity and intestinal human samples, using bioinformatics and metagenomic techniques. We found several integron integrases, including type 1 integrases, as well as conserved regions and gene cassettes, distributed in all the environmental samples analyzed, indicating that these elements are widely distributed in natural nonclinical environments. In fact, most sequences obtained are new, which indicates the existence of a variety of integrons in the environment. Despite being new sequences, most of them have common domains with previously described type 1 integrase. The intestinal human samples investigated showed less variability considering that we only found one integron integrase type 1. We have no clear evidence at present to support the conclusion that contamination increases the presence of certain integrases in natural ecosystems. The analysis of genomic and metagenomic databases searching for integrons showed similar results to those obtained when we investigate integrons in clinical and nonclinical environments. Studying the presence of integrons in different environments is important to understand the function of these elements as a reservoir of genes and their contribution in bacterial evolution, adaptability and antibiotic resistance.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

AB: antibiótico

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CU: Colitis Ulcerosa

IPTG: Isopropil- β -tiogalactopiranosido

Kb: Kilobase

LB: Luria-Bertani (medio de cultivo agar o líquido)

MH: Müller-Hinton (medio de cultivo agar o líquido)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

O/N: *over night*

pb: pares de bases

rpm: revoluciones por minuto

UFC: unidades formadoras de colonias

V: voltios

WGS: Whole Genome Shotgun (genomas parciales secuenciados)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

MGE: elementos genéticos móviles

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La adquisición de genes de resistencia a los antibióticos entre las especies patógenas sigue siendo un grave problema para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La emergencia y diseminación de estos genes de resistencia a los antibióticos constituye uno de los mejores ejemplos de evolución observado en las últimas seis décadas y que puede ser estudiado a su vez en tiempo real (Mazel 2006; Martínez *et al.* 2007). El aumento de bacterias patógenas con nuevos determinantes de resistencia y de patógenos oportunistas, con baja susceptibilidad a los antibióticos, procedentes de ambientes no clínicos son actualmente un importante problema en el ámbito comunitario e intrahospitalario. Sin embargo, se sabe muy poco de los reservorios naturales (ambientes no clínicos) de los genes de resistencia a los antibióticos (Martínez 2008).

Está ampliamente aceptado que los genes de resistencia a los antibióticos tienen su origen en bacterias medioambientales (Davies 1994) donde se ha planteado que en ocasiones pudieran cumplir una función diferente a la propia resistencia (Martínez *et al.* 2007; Martínez 2008). La selección de estos genes de resistencia no ocurre solamente como consecuencia de la presión selectiva de los antibióticos. Existen otros factores que podrían favorecer la co-selección de estos genes como por ejemplo la presión que ejercen los contaminantes químicos o metales pesados (Alonso *et al.* 2001). Summers y colaboradores demostraron que ciertos determinantes de resistencia a mercurio se co-transferían junto con genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *Enterobacteriaceae* (Summers *et al.* 1993). Posteriormente, se observó que cepas de *Salmonella abortus* se hacían sensibles a arsénico, cromo, cadmio y mercurio al perder un plásmido con resistencia a ampicilina (Ghosh *et al.* 2000). No obstante, en general encontramos pocos trabajos que abordan la relación entre la resistencia a los antibióticos y la resistencia a los metales, por lo que sería importante seguir estudiando no sólo esta relación sino el posible efecto que pudiera tener la contaminación en la presencia, variabilidad y distribución de elementos de captura génica en diferentes ecosistemas.

1.1. Transferencia horizontal de genes: elementos genéticos

La Transferencia Horizontal de Genes (HGT) es abordada por los científicos desde dos puntos de vista diferentes. El primero revela cómo ocurre la HGT y las consecuencias del mismo, teniendo en cuenta que los microorganismos tratan de proteger la integridad de su genoma y por tanto la HGT tiene restricciones, mientras el segundo punto de vista estudia el número, la diversidad y la abundancia de elementos genéticos que facilitan la HGT, la reorganización del genoma, las delecciones y las inserciones. Aunque el porcentaje de HGT varía, dependiendo de la especie bacteriana, se puede decir que por término medio, el 25 % del genoma de una bacteria es obtenido a partir de otras células, bien de la misma o de diferente especie (Ochman *et al.* 2000). Se ha planteado la existencia de un conjunto dinámico de genes, llamado “mobiloma”, dentro del que se encuentran genes que se transfieren más frecuentemente que otros genes que codifican, por ejemplo, proteínas con funciones estructurales dentro de la célula o vinculadas con complejas redes de interacción de proteínas. El impacto de la HGT en la evolución de un cierto gen, estaría relacionado con la complejidad de la interacción que tenga el producto del gen con las redes metabólicas o regulatorias de la célula (Barkay 2005).

La HGT está considerada un importante elemento en el incremento de la diversidad genética y como consecuencia en la evolución bacteriana (Nemergut *et al.* 2004). La HGT no solo está involucrada en la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos, sino que también se ha visto implicada en la transferencia de genes relacionados con complejos procesos celulares como la fotosíntesis (Igarashi *et al.* 2001), la fijación de nitrógeno (Sullivan *et al.* 2001), la fijación de carbono (Utaker *et al.* 2002), la reducción de sulfato (Friedrich 2002) y la patogenicidad (Hentschel and Hacker 2001; Gamielien *et al.* 2002).

Se han identificado varios elementos genéticos que participan en el reclutamiento y la transferencia de genes como plásmidos, transposones, secuencias de inserción (IS), bacteriófagos, elementos conjugativos integrativos (ICE), islas genómicas y, más recientemente, los integrones y cassettes genéticos. Las características de éstos elementos genéticos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de los elementos genéticos implicados en HGT y en reclutamiento de genes.

Elementos Genéticos	Propiedades
Plásmidos	Replicones extracelulares lineares o circulares, autotransferibles o mobilizables, vehículos de transmisión de información genética en un amplio rango de especies.
Bacteriófagos	Virus que infectan procariotas y pueden integrarse en el genoma del huésped.
ICE	Elementos conjugativos autotransferibles que se integran en el genoma de los huéspedes como los bacteriófagos y que pueden facilitar la movilización de islas genómicas por medio de regiones de integración conservadas.
Islas genómicas	Largas regiones cromosomales adquiridas por HGT y flanqueadas por regiones repetitivas. Contienen genes para la inserción y escisión cromosomal.
Transposones	Elementos genéticos que pueden moverse dentro o entre replicones por la acción de la transposasa. Flanqueados por regiones invertidas repetidas, usualmente llevan genes de resistencia a los antibióticos u otro fenotipo, mientras que las IS codifican sólo para la transposasa.
Integrones	Elementos capaces de capturar material genético exógeno (cassettes de genes), integrarlo mediante recombinación sitio-específica y expresarlo de forma eficiente. Frecuentemente asociados a transposones y plásmidos.

La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación (DNA en plásmidos o transposones que se transfieren por fusión entre membranas), transformación (incorporación de segmentos de DNA libre dentro del cromosoma bacteriano) o transducción (transferencia física de DNA de una célula a otra mediante infección por virus). En la Fig. 1 se representan esquemáticamente los mecanismos de transferencia horizontal de genes.

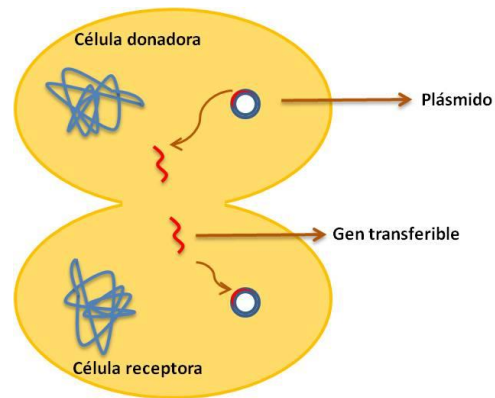
La importancia o el alcance que pudiera tener la HGT en un ambiente es difícil de estimar. No sabemos casi nada sobre el tráfico de genes que pudiera realizarse en ambientes naturales como el suelo o en el tracto gastrointestinal, donde existe un alto número de géneros bacterianos y especies (Davies 1994).

Entre los diferentes factores que pueden influir en la HGT, se ha visto que los mismos antibióticos promueven la transferencia de sus propios genes de resistencia entre diferentes bacterias. Concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden estimular el contacto célula-célula causado por pequeños cambios estructurales a nivel de la membrana externa. Estos antibióticos son

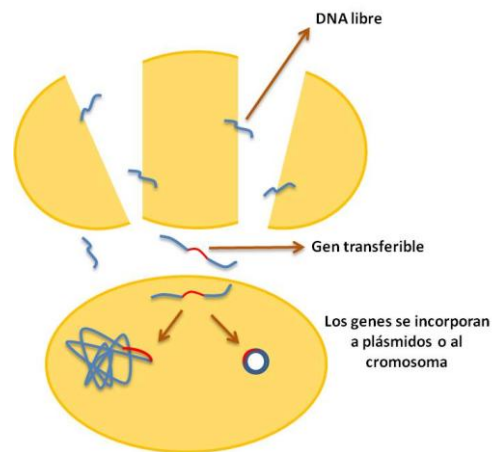
considerados feromonas por lo que se podría pensar en ésta como la función primaria de los antibióticos en la naturaleza (Mazodier and Davies 1991).

La capacidad de transferencia de un gen o conjunto de genes puede estar influenciado por los genes que se encuentran a su alrededor, facilitando la integración de otros genes, cambiando la expresión dependiendo del ambiente en el que se encuentren o incrementando la posibilidad de transferencia o captura de algún gen específico (Baquero 2004). Baquero plantea que existe un número limitado de posibles combinaciones entre los distintos elementos genéticos que dependen del tipo de interacción que se produzca, de la estabilidad de la interacción y del mínimo coste biológico de la asociación. Del mismo modo expone, en analogía con la sociedad capitalista, que la adquisición de genes o elementos genéticos aumenta la probabilidad de adquirir más elementos en un futuro y si ésta ganancia constituye una ventaja adaptativa por ejemplo, entre microorganismos que comparten el mismo ecosistema, será seleccionada y establecida para dicho hábitat.

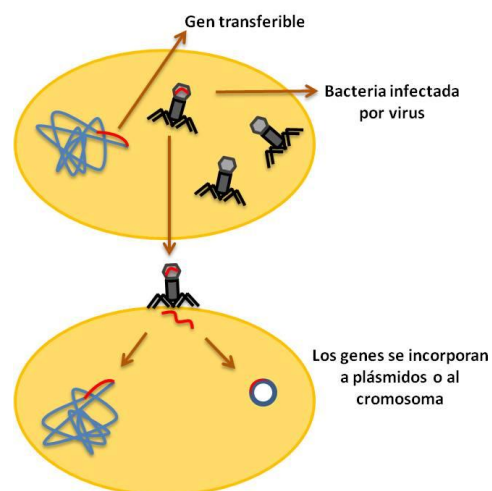
Algunos estudios sugieren que la alta densidad, diversidad y actividad bacteriana se encuentran entre los factores que favorecen los mecanismos de HGT (Van Elsas 2000; Timms-Wilson 2001). Ambientes naturales como el suelo, superficies de plantas y el agua, se encuentran entre los ecosistemas más estudiados. Se ha visto que en estos ambientes pueden crearse determinadas condiciones que favorecen la colonización y actividad bacteriana y como consecuencia la HGT. Estos sitios son denominados puntos calientes “*hot spots*” de transferencia bacteriana de genes. Las condiciones tanto abióticas (temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno, etc.) como bióticas (tipo de terreno, predadores, antagonistas, plantas, etc.) determinan conjuntamente la HGT (Van Elsas 2002). Es difícil predecir como tantos factores pueden favorecer o la conjugación, o la transformación o la transducción. Sin embargo, algunos artículos han abordado el tema y demostrado por ejemplo, que en puntos calientes de la rizosfera del suelo está favorecida la conjugación y la transformación, mientras que en puntos calientes del suelo abonado, el intestino de los animales que viven en el suelo y en sedimentos, está beneficiada la conjugación (Van Elsas 2000; Van Elsas 2002).



Conjugación



Transformación



Transducción

Fig. 1. Mecanismos mediante los cuales ocurre la HGT.

La transferencia horizontal de genes (HGT) entre diferentes bacterias puede ocurrir mediante conjugación, transformación y/o transducción.

Diferentes elementos genéticos pueden transferirse de una bacteria a otra por alguno de los mecanismos anteriormente descritos. Mientras que la transferencia de genes entre organismos del mismo género pudiera considerarse como un evento común, este proceso ha sido observado entre bacterias de géneros diferentes y en organismos con distancias evolutivas tan grandes como las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Courvalin 1994; Alekshun and Levy 2007). Los integrones, por ejemplo, originariamente descubiertos en bacterias Gram negativas, se han localizado del mismo modo en bacterias Gram positivas (Nandi *et al.* 2004). El gen de resistencia a tetraciclina, comúnmente localizado en el transposon Tn916 (Clewell 1986) ha sido encontrado en bacterias Gram positivas, Gram negativas, aeróbicas, anaeróbicas y en una gran variedad de ambientes naturales (Roberts 1996).

La transferencia horizontal de genes entre diferentes microorganismos pertenecientes a hábitats variados justifica la diseminación de la resistencia a los antibióticos y la constante aparición de cepas patógenas multirresistentes a una amplia variedad de antibióticos. Teniendo en cuenta el número de organismos resistentes, los diferentes ambientes en los que pueden localizarse y la multirresistencia que puede alcanzar un solo organismo, la resistencia a los antibióticos es un fenómeno difícilmente predecible y que va en constante aumento (Levy 2002; Levy and Marshall 2004).

1.2. Integrones

Aunque ya en la década de los 70s se sabía que la multirresistencia podía deberse a la integración de genes de resistencia en plásmidos u otros elementos genéticos, es a finales de los 80s cuando se reconoce la importancia de los integrones en la adquisición de estos genes (Stokes and Hall 1989).

Las primeras pistas sobre la existencia de estos elementos se obtuvieron estudiando el transposón Tn21. Analizando las funciones de recombinación se observaron una clase de recombinantes sitio-específicos, diferentes de los producidos por la transposasa e independientes de ésta y de los extremos invertidos del transposón (Liebert *et al.* 1999). Más tarde este tipo de recombinantes independientes, que presentan la maquinaria necesaria para la captura de material genético exógeno, se denominarían integrones. Ahora se sabe que los integrones son estructuras antiguas que podrían haber ejercido un impacto en la evolución bacteriana a lo largo de los años así como contribuir a la adquisición simultánea de genes de resistencia por las bacterias patógenas.

El sistema integrón/cassettes de genes (Fig. 2) permite el reclutamiento de genes en una única estructura facilitando la transmisión simultánea de los mismos y proporcionando a las bacterias un mecanismo para la rápida y eficaz redistribución de genes, lo que puede ser significativo en la evolución de las bacterias (Collis *et al.* 1993; Cambray *et al.* 2010) así como contribuir al incremento de la resistencia a los antibióticos en el ámbito clínico (Hall and Stokes 1993; Recchia and Hall 1995).

1.2.1. Definición y estructura

Los integrones son unidades de captura génica que contienen los elementos necesarios para la recombinación sitio-específica y la expresión de DNA foráneo. Existen varias clases de integrones, de las que hablaremos más adelante. Los más estudiados son los pertenecientes a la clase o tipo 1, por su contribución en el ambiente clínico a la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas (Leverstein-Van Hall *et al.* 2002; Labbate *et al.* 2009). En la Fig. 2 detallamos la estructura del integrón tipo 1 así como el proceso mediante el cual los cassettes de genes son repetidamente insertados por recombinación sitio-específica mediada por la integrasa *intI1*, entre el sitio *attI* del integrón y *attC* del cassette génico.

Estructuralmente los integrones se dividen en tres regiones: una región conservada 5' que contiene el gen (*intI1*) que codifica la integrasa tipo 1 y dos promotores divergentes (*P* y *Pc*) que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los cassettes de genes usualmente carentes de promotor propio con un sitio de recombinación (*attC*). La integrasa es una tirosina recombinasa sitio-específica que cataliza la integración y excisión de los cassettes. A continuación nos encontramos una región central variable en la que se localizan los genes adquiridos por el integrón. En la mayoría de los integrones conocidos son mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos. Esto se debe a que los integrones se han buscado más en ambientes clínicos por la importancia que tiene en este ambiente la adquisición y posterior diseminación de genes de resistencia a los antibióticos. Sin embargo, se sabe muy poco del papel que pueden jugar los integrones en ambientes no clínicos.

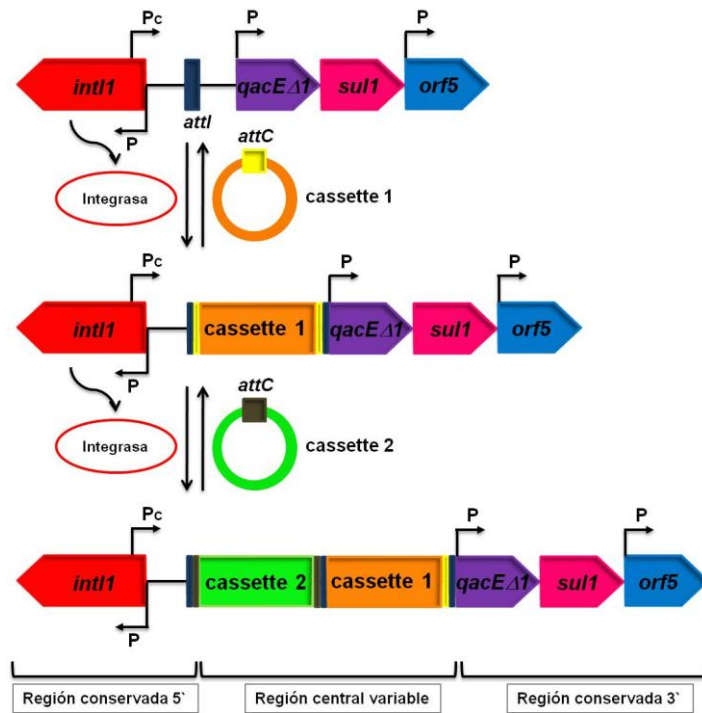


Fig. 2. Representación de la estructura y el funcionamiento de un integrón tipo 1. En la figura se representan las tres regiones que conforman la estructura del integrón y el mecanismo por el cual el integrón es capaz de capturar el material genético (cassettes) e integrarlo a su estructura mediante recombinación sitio-específica mediada por la integrasa.

El número de genes presentes en la región central variable, suele oscilar entre 1 y 8 aunque se conocen integrones descargados (In0) que no contienen ningún gen en la región central. Las regiones conservadas 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes de la región central poseen en su extremo 3' un sitio de recombinación *attC*, conocido también como segmento de 59 pares de bases, por el que se produce la recombinación sitio-específica para la inserción o escisión de genes.

Por último, a continuación de la región central, encontramos una región conservada 3' en la que se encuentra el gen *qacEΔ1*, determinante de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio, como determinados antisépticos y desinfectantes, el gen *sul1*, que determina resistencia a sulfonamidas y una zona de lectura abierta *orf5*, cuya función se desconoce hasta el momento (Stokes *et al.* 2001). Los integrones tipo 2 y 3, de los que hablaremos más adelante, no presentan en su extremo 3' una estructura conservada como es el caso del integrón tipo 1. Estos integrones suelen

contener en ese extremo los elementos necesarios para la transposición (Mazel 2006; Boucher *et al.* 2007).

Como se ha dicho anteriormente, las integrasas pertenecen a la familia catalítica de las tirosina recombinasas (Nunes-Duby *et al.* 1998), formando parte de una subfamilia muy específica donde las proteínas más cercanas son las recombinasas tipo Xer (Boyd *et al.* 2009). La familia de las tirosina recombinasas están involucradas también, en el movimiento horizontal de numerosos fagos y en importantes procesos celulares como la resolución de los dímeros del cromosoma durante la división celular. A diferencia de otros miembros de la familia, las integrasas pueden recombinar secuencias con baja similitud (Mazel 2006). El gen de la integrasa usualmente se encuentra orientado en el sentido opuesto a los cassettes de genes situados en la región central del integrón. Sin embargo, también se han encontrado integrones con la integrasa orientada en el mismo sentido de los cassettes, a los que se han denominado "*inverted integrase integrons*" o integrones con la integrasa invertida (Boucher *et al.* 2007).

Son muchos los genes de resistencia a antibióticos descritos que pueden incluirse en la región central de la estructura de un integrón. Pueden ser muy variados y causar resistencia por diferentes mecanismos, como es el caso de los genes de resistencia a los aminoglucósidos, que son los más numerosos y de los que se han identificado tres familias diferentes, subdivididas a su vez en varios grupos. Cada uno de los genes de estas familias codifica una proteína diferente (acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas o fosfotransferasas). En el interior de los integrones también se han encontrado genes de resistencia a trimetopim, cloranfenicol y betalactámicos (Mazel 2006). Además, las fases de lectura abierta cuya función se desconoce todavía pudieran codificar determinantes de resistencia a otras clases de antibióticos.

Se cree que las secuencias *attC* de los cassettes de genes dotan a la inserción de una direccionalidad. De esta forma, los cassettes se insertan en la misma dirección y pueden ser transcritos a partir del promotor situado en la región 5' (Collis and Hall 1995).

En algunas ocasiones se ha observado la presencia de un segundo promotor unido al promotor *Pc*, mediante el cual se incrementa la transcripción de los cassettes (Levesque *et al.* 1994). También se han encontrado integrones que carecen de los genes *qacEΔ1* y *sul1* en el extremo 3'. Varios autores sugieren que podría tratarse de un integrón primitivo a partir del cual han

evolucionado los actuales en los que dichos genes se insertaron y conservaron (Bissonnette and Roy 1992), probablemente por la ventaja selectiva que supone la expresión de estos genes frente al masivo uso clínico de compuestos como el cloruro de benzalconio, la acriflavina y las sulfonamidas (Paulsen *et al.* 1993).

Los integrones constituyen una plataforma estable de reclutamiento de genes, pero inmóvil. Solo asociados a elementos móviles como transposones, plásmidos, etc., que les sirven de vehículos para su transmisión, es posible su diseminación entre diferentes microorganismos. El hecho de encontrar en una única estructura varios cassettes de genes, permite la transmisión de diversos genes al mismo tiempo, lo que podría constituir una ventaja para el microorganismo receptor.

1.2.2. Clasificación

Actualmente están descritas hasta 9 clases de integrones definidas sobre la base de la secuencia de la integrasa, pero si hablamos de aquellas relacionadas con la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, encontramos solo 5 grupos o clases de integrones (Mazel 2006; Labbate *et al.* 2009). Estas 5 clases han sido encontradas ligadas a elementos móviles como secuencias de inserción, transposones y plásmidos conjugativos, que permiten la transmisión del material genético contenido en los integrones (Mazel 2006).

La clase 1 es la más comúnmente encontrada entre bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Entre un 22 % - 59% de los aislados clínicos de bacterias Gram negativas portando un integrón, contienen el integrón tipo 1 (Sallen *et al.* 1995; Maguire *et al.* 2001). Aunque la mayoría de los integrones tipo 1 han sido hallados en bacterias Gram negativas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, cada vez hay más estudios que vinculan esta clase de integrones con bacterias Gram positivas como *Corynebacteria*, *Aerococci*, *Brevibacteria* y *Staphylococci* (Nesvera *et al.* 1998; Tauch *et al.* 2002; Nandi *et al.* 2004; Xu *et al.* 2007b).

La integrasa tipo 1 reconoce el sitio de recombinación *attI* presente en el integrón, *attC* de los cassettes génicos, así como otros sitios secundarios de recombinación (Biskri *et al.* 2005; Labbate *et al.* 2009). Los integrones tipo 1 están relacionados con transposones funcionales y no funcionales derivados de la familia de los Tn402, que han sido embebidos en largos transposones como el Tn21 (Brown *et al.* 1996). La mayoría de los cassettes que portan genes de

resistencia a los antibióticos están incluidos dentro de la estructura de un integrón tipo 1. Entre ellos podemos destacar aquellos cassettes que confieren resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas, entre muchos otros (Rowe-Magnus and Mazel 2002; Mazel 2006).

Sin embargo, solo 6 cassettes diferentes se han relacionado con los integrones tipo 2 (Biskri and Mazel 2003), asociados exclusivamente con la familia del transposón Tn7 (Sundstrom *et al.* 1991; Radstrom *et al.* 1994). Los integrones tipo 2 se han encontrado en *Acinetobacter* (Gonzalez *et al.* 1998), *Shigella* (McIver *et al.* 2002), *Salmonella* (Orman *et al.* 2002; Ahmed *et al.* 2005; Rodriguez *et al.* 2006) y *Helicobacter* (Crespo *et al.* 2005). La integrasa IntI2 posee un 40 % de homología con la IntI1 y contiene una mutación que hace de ésta una proteína truncada, no funcional, por lo que la integración y escisión de cassettes en este tipo de integrones depende de la acción de otra integrasa (Mazel 2006). En algunos casos, los organismos que poseen integrones tipo 2 también presentan integrones tipo 1, por tanto es la integrasa tipo 1 la encargada de realizar dicha función (Hansson *et al.* 2002). Se ha planteado que la mutación presente en la integrasa tipo 2 es la causa de la baja diversidad de cassettes que puede integrarse en el integrón tipo 2. Sin embargo, los integrones tipo 2 han sido encontrados en diferentes aislados clínicos, contribuyendo a la resistencia a los antibióticos. Además, el hecho de encontrarse asociada con el transposón Tn7 garantizaría su diseminación en el ambiente nosocomial (Biskri and Mazel 2003; Ahmed *et al.* 2005; Ramirez *et al.* 2010). Recientemente, se ha encontrado un integrón tipo 2, con la integrasa funcional, y con 4 genes no asociados a la resistencia a los antibióticos, lo que pone en duda la teoría de la baja diversidad en los integrones tipo 2 (Barlow and Gobius 2006).

La clase 3 posee alrededor del 61 % de homología con IntI1 y ha sido localizada en transposones insertados en plásmidos aún sin caracterizar y en géneros como *Pseudomonas*, *Serratia* y *Klebsiella* (Collis *et al.* 2002; Correia *et al.* 2003). La integrasa IntI3 es raramente encontrada en el ambiente clínico, reconoce diferentes sitios *attC* y es capaz de recombinar estos sitios *attC* con sitios secundarios de recombinación, pero con menos frecuencia que la IntI1 (Labbate *et al.* 2009). También se ha encontrado el integrón tipo 3 en el cromosoma de dos especies de *Deftia*, con la característica de que estaba flanqueado por una integrasa similar a otra, hallada en un integrón de origen ambiental tipo 1, en *Azoarcus communis* y *Acidovorax sp* (Xu *et al.* 2007a).

La clase 1 (Stokes *et al.* 2006; Gillings *et al.* 2008), la clase 2 (Barlow and Gobius 2006) y la clase 3 (Xu *et al.* 2007a), no asociadas con genes de resistencia a los antibióticos y conteniendo cassettes con funciones desconocidas, han sido encontradas en bacterias medioambientales. Estos estudios indican que los integrones no están exclusivamente involucrados en la resistencia antibiótica sino que también pudieran desempeñar una función relacionada con la adaptación de las bacterias a diferentes ecosistemas. De hecho, parece ser que el número de genes de resistencia a los antibióticos es bajo en comparación con la variedad de cassettes encontrados en las muestras ambientales (Stokes *et al.* 2001; Michael *et al.* 2004). La prevalencia de funciones de resistencia atribuidas a los integrones es resultado de la búsqueda de estos elementos en el ambiente clínico, reflejando así el éxito evolutivo de los integrones en diferentes entornos (Michael *et al.* 2004; Cambray *et al.* 2010).

La clase 4 y la clase 5 han sido identificadas en el contexto de la resistencia a trimetoprim en cepas de *Vibrio*. La clase 4 se encuentra dentro de un elemento integrativo y conjugativo SXT hallado en *Vibrio cholerae* (Hochhut *et al.* 2001). La clase 5 ha sido localizada en un transposón asociado a un plásmido en *Alivibrio salmonicida* (Sorum *et al.* 1992). El resto de las integrasas (IntI6, IntI7, IntI8, IntI9) han sido definidas en base a homologías de secuencias, en algunos casos de fragmentos parciales, y no hay ni datos funcionales ni acerca del ambiente genético en el que se encuentran. Además de estas integrasas que aparecen designadas como IntI, existe un gran número de secuencias de proteínas, en las bases de datos, denominadas integrón integrasas, correspondientes en su mayoría a bacterias no cultivadas de integrones hallados en ambientes naturales.

En general, las secuencias de las diferentes integrasas comparten múltiples zonas en común. El porcentaje de homología respecto a la integrasa IntI1 está comprendido entre un 40 % y un 58 % (Mazel 2006).

1.2.3. Cassettes génicos: estructura y función

Los cassettes génicos son los elementos mobilizables más pequeños que se conocen hasta el momento. Usualmente contienen un único gen y un sitio de recombinación *attC* en su extremo 3' (Stokes and Hall 1989; Collis *et al.* 1993; Labbate *et al.* 2009). Los cassettes pueden hallarse de dos formas, como un elemento circular independiente o de forma lineal cuando está insertado

dentro de un integrón por recombinación sitio-específica (Hall *et al.* 1991). La inserción del cassette está orientada para que el gen pueda ser expresado bajo la acción del promotor *Pc* (Fig. 2) (Collis and Hall 1992a; Stokes *et al.* 2001).

Los sitios de recombinación *attC* son secuencias repetidas invertidas e imperfectas, que pueden tener una longitud entre 57 y 141 pb. El primer *attC* descrito poseía una extensión de 59 pb por lo que la denominación de “segmento de 59 pb” se emplea usualmente para nombrar los sitios *attC*, aún sabiendo que éstos no constituyen secuencias conservadas (Stokes *et al.* 1997).

Los sitios de recombinación *attC* (Fig. 3) presentan en sus extremos 7 pares de bases, llamados *core* y *core inverso*, cuya secuencia consenso en el extremo 5' es RYYYAAC y en el extremo 3' es GTTRRRY, donde R puede ser A o G y Y puede ser C o T. El centro de la secuencia es una región variable. En el extremo 5' del cassette se localiza una secuencia consenso del sitio *attI* de forma tal que el cassette génico queda flanqueado por dos secuencias idénticas (Stokes *et al.* 1997).

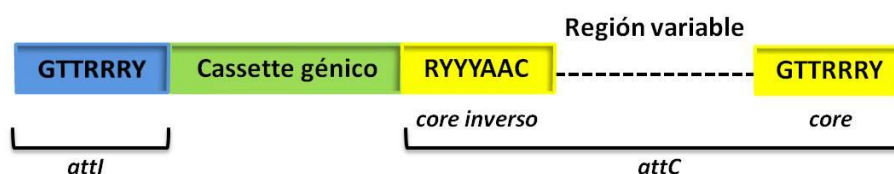


Fig. 3. Representación de la estructura de un cassette génico.

Como se observa en la figura el cassette génico queda flanqueado por los *cores* de los sitios *attI* y *attC*.

La recombinación mediada por la integrasa tiene lugar entre la G del sitio *attI* y la primera T del sitio *attC*. Como se ha hablado en el apartado 1.2.2, la integrasa puede reconocer varios sitios de recombinación por lo que ésta puede efectuarse entre un sitio *attI* y un sitio *attC*, dos *attC* o entre un sitio *attC* y un sitio secundario de recombinación que usualmente presenta la siguiente secuencia consenso: GWTMW, donde W puede ser T o A y M puede ser A o C (Stokes *et al.* 1997; MacDonald *et al.* 2006; Labbate *et al.* 2009).

La integración repetida de cassettes génicos en el sitio *attI*, da lugar a un conjunto de cassettes dentro de una misma estructura, la del integrón, a los que se ha denominado “*cassette array*” (Bissonnette and Roy 1992; Collis *et al.*

1993; Recchia *et al.* 1994). Como se ha mencionado, los cassettes comúnmente carecen de promotor, por lo que su expresión está condicionada por la proximidad al promotor *Pc* del integrón. Los cassettes más próximos al promotor se expresaran más en comparación con aquellos que se encuentren más alejados del extremo 5'. En este hecho también podría influir que las repeticiones invertidas de los sitios *attC* formen *loops*, actuando como terminadores de la transcripción y no permitiendo la expresión de los cassettes más distantes. Desde el punto de vista de la resistencia a los antibióticos, la localización de un cassette en una u otra posición del integrón, afectaría el nivel de resistencia adquirido por un organismo determinado (Collis and Hall 1995; Cambray *et al.* 2010).

Los integrones movilizables de las clases 1, 2 y 3, descritos en el apartado 1.2.2, pueden contener desde 0 a 8 cassettes génicos, a diferencia de los superintegrones o integrones cromosomales, de los que hablaremos más adelante, encontrados en *Vibrio vulnificus*, con 217 cassettes o *Pseudomonas alcaligenes*, con 32 cassettes, por citar algunos (Naas 2001; Labbate *et al.* 2009). Alrededor de 130 diferentes cassettes que en su mayoría son genes de resistencia a los antibióticos han sido identificados formando parte de la estructura de los integrones (Fluit and Schmitz 2004; Partridge *et al.* 2009).

La localización de los integrones en el cromosoma, plásmidos, etc., indica que la forma lineal de los cassettes es estable dentro de la célula. Estudios en diferentes hospitales muestran que los integrones son estructuras estables con secuencias conservadas de cassettes génicos a lo largo del tiempo (Martinez-Freijo 1999). Sin embargo, en muchos casos se desconoce el producto del gen que llevan consigo. De hecho, se han encontrado cassettes no codificantes (sin ORF) pero con una secuencia conservada que sugiere la posibilidad de que éstos ejerzan una función biológica dentro de la célula (Holmes *et al.* 2003). También hay estudios, *in vitro*, donde se ha visto que en el integrón pueden ocurrir cambios en el orden de los cassettes, deleciones y duplicaciones (Collis and Hall 1992b).

No se sabe prácticamente nada acerca de la posibilidad de intercambio de cassettes entre distintos integrones. No obstante, un estudio *in vitro* en *Salmonella enterica* usando diferentes plásmidos demuestra que éste intercambio es posible (Sandvang *et al.* 2002).

Existen muchos ejemplos de cassettes génicos descritos entre los que se encuentran, por ser los más buscados, los genes de resistencia a los antibióticos. Entre ellos podemos destacar los genes de resistencia a β -

lactámicos, aminoglucósidos, trimetropim y cloranfenicol. También podemos encontrar genes de resistencia a antisépticos (Recchia and Hall 1995; Rowe-Magnus and Mazel 2002). Otros cassettes incluyen genes con ventajas funcionales como factores de virulencia, proteínas de transporte, actividad metiltransferasa, entre muchas otras ligadas a procesos celulares y metabolismo. Un gran número de cassettes no han sido todavía caracterizados y el grupo más amplio de éstos pertenece a proteínas nuevas carentes de homólogos conocidos (Ogawa and Takeda 1993; Barker and Manning 1997; Kim *et al.* 2003; Nemergut *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Elsaied *et al.* 2007; Robinson 2007), lo que acentúa la importancia que tienen los integrones en la captura de genes de una amplia diversidad (Cambray *et al.* 2010).

Las combinaciones más frecuentes integrón/cassettes génicos, deberían ser aquellas que son seleccionadas teniendo en cuenta las condiciones ambientales. Estas combinaciones serían ventajosas o útiles para los organismos que forman el ecosistema, aunque también se plantea que existe un cierto azar en la incorporación de los cassettes, dado que las funciones de varios de ellos pueden ser equivalentes (Rowe-Magnus *et al.* 2002; Michael *et al.* 2004).

1.2.4. Superintegrones

A finales de los años 90s, Mazel descubre en el cromosoma 2 de *Vibrio cholerae*, una agrupación de secuencias repetidas de DNA con similar organización a la de un integrón, definida posteriormente con el nombre de superintegrón. Este superintegrón contenía 214 fases de lectura abierta en 179 cassettes, muchos de ellos con función desconocida (Mazel *et al.* 1998).

Son varias las características que distinguen a los superintegrones de los integrones que hemos mencionados hasta ahora. Los superintegrones codifican una integrasa específica llamada VchIntIA, poseen un gran número de cassettes de genes con más del 80% de identidad en su sitio *attC* y finalmente están localizados en el cromosoma, por lo que no están asociados con elementos de movilidad genética (Heidelberg *et al.* 2000; Mazel 2006).

Los superintegrones han sido identificados en diferentes grupos como: *Vibrionaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Alteromonadaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, en varias β y δ -proteobacterias, entre otros. La característica general encontrada en estos grupos es el gran tamaño de los

superintegrones, la presencia de un gran número de cassettes y la homología entre los sitios *attC* (Rowe-Magnus *et al.* 2001; Rowe-Magnus and Mazel 2002; Mazel 2006). Sin embargo, también se han descubierto superintegrones que no comparten las mismas características que las descritas para un “típico” superintegrón y que son similares a las encontradas en los cassettes de los integrones asociados a elementos de movilidad génica (Mazel 2006).

Del mismo modo que los cassettes encontrados en los integrones, en los superintegrones se han hallado genes de resistencia a los antibióticos, como por ejemplo a aminoglucósidos. En *Vibrio cholerae* se han encontrado factores de virulencia, lipoproteínas y otros genes involucrados tanto en resistencia a los antibióticos como a funciones adaptativas (Ogawa and Takeda 1993; Abbott and Janda 1994; Barker and Manning 1997). Otras proteínas codificadas por cassettes presentes en los superintegrones son enzimas de restricción o involucradas en el metabolismo primario (Rowe-Magnus *et al.* 1999; Vaisvila *et al.* 2001; Rowe-Magnus *et al.* 2003; Boucher *et al.* 2006). En muchos casos también se han encontrado, transposones o recombinasas formando parte del cassette array o flanqueando el superintegrón, lo que constituye una evidencia de transferencia horizontal de genes (Boucher *et al.* 2007).

Varios superintegrones pertenecientes a diferentes especies de *Vibrio* han sido secuenciados. Todos ellos contienen un gran número de cassettes asociados, desde 70 encontrados en el genoma de *Vibrio parahaemolyticus* (Makino *et al.* 2003) hasta 200 cassettes en *Vibrio vulnificus* (Chen *et al.* 2003).

Se ha demostrado que los superintegrones son estructuras antiguas mediante estudios basados en comparaciones entre la integrasa del superintegrón y los RNA16S. Teniendo en cuenta esto y el hecho de que los integrones y superintegrones comparten una estructura semejante, actualmente se plantea la posibilidad de que los integrones pudieran haber evolucionado a partir de los superintegrones, adquiriendo los genes *intl* y asociándose a sitios *attI* dentro de estructuras móviles como transposones y plásmidos (Mazel *et al.* 1998; Rowe-Magnus and Mazel 2002; Mazel 2006). Sin embargo, todos los integrones implicados en la resistencia a los antibióticos tienen integrasas tipo *IntI* y secuencias *attC* características de cada tipo de cassette, lo que sugiere que, aunque los superintegrones y los integrones implicados en resistencia tienen un origen filogenético común, en la actualidad son dos ramas evolutivas diferenciadas de elementos de captura génica.

1.3. Ecosistemas naturales como origen de la resistencia a los antibióticos

Uno de los mayores avances en el tratamiento de las enfermedades infecciosas ha sido, sin duda alguna, el descubrimiento de los antibióticos. Sin embargo, la aparición de bacterias resistentes no se hizo esperar. Casi al mismo tiempo a la introducción de la terapia antimicrobiana en la práctica clínica, comenzaron a hallarse bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, lo que nos hace pensar en la gran diversidad y flexibilidad genética de las bacterias.

Esta rápida resistencia desarrollada por las bacterias tras el uso de los antibióticos fue atribuida, en un inicio, a mutaciones en los blancos de los antibióticos en las bacterias patógenas, justificando así las primeras observaciones de resistencia a sulfonamidas y penicilinas en neumococos y a estreptomicina en micobacterias. Sin embargo, en el año 1961, se aíslan cepas de *Shigella dysenteriae* multirresistentes a sulfonamidas, tetraciclina, estreptomicina y cloranfenicol (Mitsunashi 1961). Estaba claro que este hallazgo no podía sustentarse solamente con el desarrollo de mutaciones y que existían otros factores contribuyendo a la resistencia a los antibióticos.

A partir de aquí, diferentes estudios demuestran la implicación de la HGT en la resistencia a los antibióticos. Se descubren los primeros elementos móviles (plásmidos resistentes) (Watanabe 1963), las primeras secuencias de inserción IS (Jordan 1968; Shapiro 1969) y su relación con determinantes de resistencia (Datta *et al.* 1971; Richmond and Sykes 1972) y los primeros transposones e integrones (Berg *et al.* 1975; Stokes and Hall 1989; Martinez and de la Cruz 1990).

Estudios en bacterias Gram negativas patógenas de la era pre-antibiótica indican que éstas no contenían genes de resistencia a los antibióticos (Datta and Hughes 1983; Hughes and Datta 1983), por lo que la adquisición de estos genes es consecuencia de la interacción de las bacterias patógenas con bacterias medioambientales localizadas en ambientes no clínicos, siendo éstos el origen de los genes de resistencia.

Los genes de resistencia a los antibióticos son comunes en las bacterias medioambientales y existen mucho antes del uso de los antibióticos. Análisis filogenéticos para determinar el origen de las serina β -lactamasas, descubrieron que la presencia de éstas databa de 2 mil millones de años y

sugería que muchas de ellas eran codificadas en plásmidos millones de años atrás (Hall and Barlow 2004).

Los ambientes naturales (no clínicos) son la fuente de los genes de resistencia a los antibióticos y están involucradas en dicho origen tanto bacterias productoras de antibióticos como las no productoras. En el caso de las primeras estaría claro que los genes de resistencia a los antibióticos tendrían una función protectora en estos organismos (Benveniste and Davies 1973; Davies 1994). El caso de los organismos no productores es más complejo. Los genes de resistencia a los antibióticos no habrían evolucionado para cumplir esta función sino que su papel en la bacteria sería otro, de modo que la resistencia a los antibióticos sería una función secundaria. Por ejemplo, se sabe que algunas bombas de expulsión de antibióticos MDR contribuyen a la expulsión de compuestos diferentes a los antibióticos como compuestos tóxicos, solventes, señales de quorum sensing o intermedios metabólicos entre otros (Isken and de Bont 1996; Isken 1997; Piddock 2006; Martinez *et al.* 2009) y que las betalactamasas cromosomales pudieran estar involucradas en el metabolismo del peptidoglicano (Adachi *et al.* 1992). Más recientemente, se ha visto que la resistencia intrínseca a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* es debida a diferentes genes con funciones metabólicas, de señalización, en la homeostasis, entre muchas otras, que contribuyen a la resistencia intrínseca en esta bacteria (Fajardo *et al.* 2008).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, de que los genes de resistencia a los antibióticos pudieran tener una función en la fisiología de las bacterias, hay que considerar entonces, la posibilidad de que factores ambientales seleccionen a bacterias resistentes a los antibióticos. Ambientes contaminados con compuestos químicos procedentes de la industria, contaminación por metales pesados así como otros factores climáticos como la temperatura, pH, etc., actúan como elementos de presión selectiva, condicionando la presencia de aquellas bacterias que porten genes que confieren resistencia a determinados antibióticos, bien en su cromosoma o bien en elementos genéticos móviles como integrones asociados a plásmidos.

Del mismo modo que en el ambiente clínico, el uso de los antibióticos en la agricultura constituye un factor de selección de genes de resistencia a los antibióticos. Diferentes tipos de antibióticos, usados igualmente en la clínica, como amoxicilina y eritromicina, son frecuentemente empleados de manera profiláctica en el tratamiento de enfermedades infecciosas en las granjas de animales, en los piensos y el agua (Sarmah *et al.* 2006). Los antibióticos

persisten en el suelo y en el agua (Thiele-Bruhn 2003; Cabello 2006; Segura *et al.* 2009), de modo que la presión selectiva de los antibióticos usados tanto en la clínica como en la agricultura, promueve la evolución, transmisión y diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, independientemente de su origen (Allen *et al.* 2010).

Los ecosistemas naturales siguen siendo importantes reservorios para la emergencia, diseminación y evolución de posibles nuevos genes de resistencia a los antibióticos (Coque 2004) y de otros muchos genes, no necesariamente relacionados con la resistencia a los antibióticos, que todavía no han sido caracterizados y que por tanto, desconocemos las funciones que pudieran estar desempeñando en la naturaleza.

1.4. Diversidad bacteriana: Metagenomas

Los integrones, al igual que los genes de resistencia a los antibióticos se han descubiertos en el contexto de la multirresistencia en hábitats clínicos (Paulsen *et al.* 1993; Nesvera *et al.* 1998; Rowe-Magnus and Mazel 2002; Freijo 2006). Sin embargo, no están confinados a estos ecosistemas. Se han encontrado genes de resistencia a antibióticos en bacterias localizadas en ambientes no clínicos y que no han estado expuestos a la presión selectiva por los antibióticos (Alonso *et al.* 2001). De hecho, el origen de los genes de resistencia son los ecosistemas naturales (no clínicos), por lo que tanto en el origen de los genes de resistencia como en la captura y transmisión de genes por HGT, han desempeñado un papel importante la diversidad de los microorganismos presentes en los ambientes naturales.

Los suelos poseen una inmensa diversidad de microorganismos que ha sido poco explorada debido al carácter no cultivable de la mayoría de ellos. Está ampliamente aceptado que cerca del 98 % de los microorganismos presentes no se pueden cultivar en condiciones de laboratorio (Chen *et al.* 2002; Venter 2006). También se sabe que elementos genéticos como plásmidos o integrones están involucrados en la adaptación de las bacterias del suelo para la colonización de nuevos nichos ecológicos o para sobrevivir a cambios en los ecosistemas. Estos dos aspectos, hacen de los suelos una fuente de variabilidad genética y biológica poco investigada. Teniendo en cuenta esto, ¿cómo analizar las variaciones que se puedan producir en las poblaciones bacterianas como consecuencia del impacto de factores ambientales como la temperatura, la presión o la presencia de contaminantes?

El avance en las técnicas de biología molecular ha permitido extraer y analizar el DNA total directamente de las muestras ambientales sin necesidad de un cultivo previo. La necesidad de cultivar las bacterias en una muestra, ha sido substituida por la capacidad de aislar y caracterizar el material genético. Al conjunto de los genomas de los microorganismos presentes en una muestra de un nicho ecológico determinado, se le denomina “metagenoma” (Rondon *et al.* 2000). Todas las tecnologías metagenómicas están basadas en metodologías independientes de cultivo.

Hasta ahora, la cantidad de microorganismos que se conoce del suelo es un porcentaje muy bajo. Se pudiera pensar que los genes de resistencia a los antibióticos podrían estar albergados en especies no conocidas y que el paso de un determinado gen a una bacteria patógena conocida en respuesta a la presión por el uso de los antibióticos, sea consecuencia de una cascada de mecanismos de transferencia horizontal de genes entre un gran número de especies no descritas hasta el momento (Davies 1994), lo que es difícil de demostrar.

Para estudiar hasta qué punto las modificaciones del medio ambiente debidas a la contaminación pueden provocar cambios en las poblaciones bacterianas y por tanto en la transferencia horizontal de genes, investigaremos el posible efecto de la contaminación en la distribución de elementos de captura de genes, la presencia de elementos de movilidad genética e igualmente buscaremos si existe o no una especificidad de cassettes génicos en la estructura de los integrones en los distintos ecosistemas.

En nuestro trabajo de tesis, hemos analizado muestras procedentes de diferentes ambientes no clínicos, contaminados (lindano y arsénico), no contaminados (zona protegida de Extremadura) y aislados de la actividad humana (fosa Urania). Además hemos utilizado técnicas bioinformáticas para el análisis de la distribución de estos elementos de captura en diferentes ambientes en bases de datos de genomas y metagenomas secuenciados.

También nos hemos propuesto, debido a la importancia de los elementos de captura de genes en el ambiente clínico, estudiar muestras procedentes del metagenoma del intestino humano, así como la búsqueda de genes de resistencia a los antibióticos en diferentes ambientes naturales extremos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

1. Análisis de la presencia de elementos de captura génica en ambientes clínicos y no clínicos.
2. Estudio de la distribución hábitat-específica así como la variabilidad de elementos de captura génica en diferentes ambientes naturales no clínicos: contaminados, no contaminados, alejados de la actividad humana y en una microbiota humana: muestras intestinales humanas.
3. Análisis del efecto de la contaminación sobre la variabilidad de elementos de captura génica en ambientes naturales no clínicos.
4. Cuantificación de las integrasas presentes en ambientes contaminados y no contaminados.
5. Uso de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de los genes presentes en los integrones en bases de datos de genomas completos, parciales y metagenomas.
6. Búsqueda de genes de resistencia a los antibióticos en ambientes extremos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Muestras medioambientales

En este estudio, se analizaron diferentes muestras procedentes de medioambientes variados, según se indica en la Tabla 2. En la tabla se detalla, además, la descripción general, el tipo de suelo y el número de muestras analizadas.

Tabla 2. Muestras medioambientales.

Localización	Descripción	Tipo de suelo	Número de muestras	Referencia/ Origen
Chemnitz, Alemania	Fábrica de productos químicos	Suelo contaminado con lindano	2	Víctor de Lorenzo
Hamburg, Alemania	Sitio industrial	Suelo contaminado con lindano	2	Víctor de Lorenzo
Salamanca, España	Suelo de pasto con gramíneas y malas hierbas	Suelo contaminado con arsénico	3	(Paez-Espino <i>et al.</i> 2009)
Barruecos, Extremadura, España	Zona forestal protegida	Suelo no contaminado	6	Este estudio
Urania, Mar Mediterráneo, España	Fosa marina a 3550m de profundidad	Sedimento, no contaminado, alejado de la actividad humana	1	(Ferrer <i>et al.</i> 2005)

El lindano o hexaclorociclohexano es un insecticida organoclorado con una gran persistencia en el ambiente. Ha sido utilizado durante años, pero actualmente está prohibido en todas sus formulaciones por su efecto negativo para la salud humana y medioambiental. El arsénico, por su parte, es altamente tóxico y está considerado como uno de los mayores contaminantes ambientales producto de la actividad humana.

El grado de contaminación para el caso de las 3 muestras contaminadas con arsénico se detalla en la Tabla 3. También pueden observarse distintas características de los suelos como el pH, el porcentaje de materia orgánica, arena, limo y arcilla. La mayor contaminación por arsénico se encuentra en la muestra denominada EC con 960 mg de arsénico por kilogramo de suelo. Las

muestras contaminadas con lindano se recogieron en los alrededores de una zona industrial en Alemania. No tenemos los datos ni de las características de los suelos ni del grado de contaminación.

Tabla 3. Características generales de las muestras de suelos contaminadas con arsénico.

Nombre de la muestra	pH	Materia orgánica	Arena	Limo	Arcilla	mg As/kg
Terrubias (T)	4,2	0,53 %	82 %	7,4 %	9,8 %	240
Losacio (L)	5,3	2,40 %	60,5 %	16,4 %	23 %	580
El Cabaco (EC)	5,1	2,79 %	52,8 %	14 %	33,2 %	960

Además de las muestras de suelos contaminados y no contaminados, se estudió una muestra procedente de un ambiente alejado de la actividad humana, como es el caso de la fosa marina Urania.

Se analizaron un total de 14 muestras de ambientes diferentes. La ubicación geográfica de cada una de ellas se observa en la Fig. 4.



Fig. 4. Localización geográfica de las muestras de suelos y la fosa marina Urania analizadas en el estudio.

Las muestras investigadas se sitúan en diferentes ecosistemas naturales.

También se analizaron muestras procedentes del metagenoma intestinal humano cedidas por Rosa de Campo del Hospital Ramón y Cajal, descritas en la Tabla 4.

Tabla 4. Muestras intestinales humanas.

Descripción	Número de muestras
Pacientes con colitis ulcerosa	10
Muestras sucesivas en el transcurso de un año de un paciente con colitis ulcerosa	4
Voluntarios sanos	26
Total de muestras analizadas	40

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del colon (intestino grueso) y el recto. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon.

3.2. Aislamiento de DNA

La extracción del DNA total de cada una de las muestras de suelos se realizó a partir de 10 gramos de suelo utilizando el kit PowerMax™ Soil de (MOBIO laboratories), siguiendo para ello las instrucciones del fabricante. Los DNAs de origen intestinal fueron cedidos por Rosa de Campo del Hospital Ramón y Cajal.

Los DNAs se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE y se determinó su concentración usando un espectrofotómetro.

3.3. Pre-amplificación del DNA

Se realizó una pre-amplificación isotérmica de las muestras de DNA antes de la PCR con el objetivo de aumentar el número de copias presentes así como reducir el efecto de sustancias inhibidoras de la PCR comúnmente presentes en las muestras medioambientales. Un esquema de la reacción se muestra en la Fig. 5.

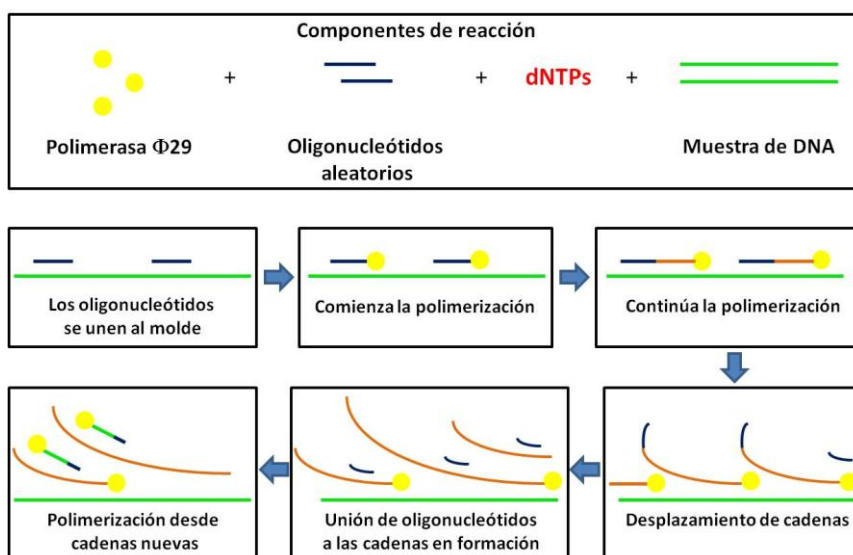


Fig. 5. Representación esquemática del paso de pre-amplificación realizado en el estudio.

Los oligonucleótidos se unen al molde de DNA por diferentes sitios. La polimerasa $\Phi 29$ comienza la polimerización dando lugar a múltiples desplazamientos de cadena en el molde de DNA desnaturalizado. El ciclo se repite dando como resultado dobles cadenas de DNA.

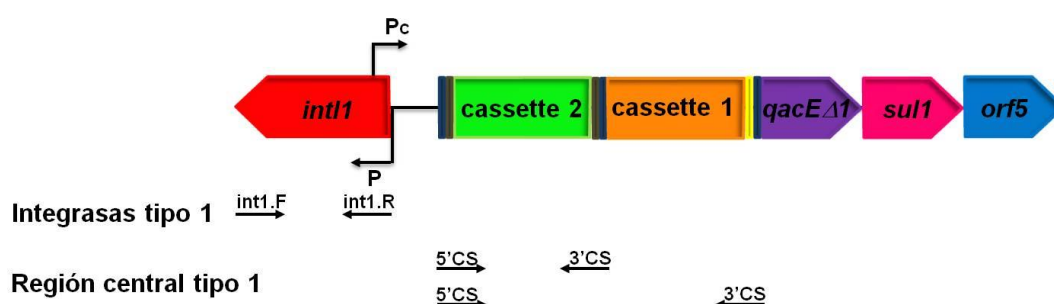
Para la reacción de pre-amplificación se usó el kit Genomiphi DNA amplification (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante: 1 μ l de DNA extraído en 9 μ l de tampón de muestra que contiene oligonucleótidos aleatorios fue desnaturalizado 3 min a 95 $^{\circ}$ C y luego colocado en hielo; 9 μ l de tampón de reacción que contiene los dNTPs más 1 μ l de la polimerasa $\Phi 29$ fue añadido a la mezcla anterior e incubado a 30 $^{\circ}$ C de 16 - 18 horas. Finalmente se incubó la reacción a 65 $^{\circ}$ C, 10 minutos, para la inactivación de la enzima.

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando diferentes cebadores (Tabla 5) se amplificaron integrasas tipo 1 y regiones conservadas de los integrones tipo 1. En la Fig. 6 se representa la localización de los oligonucleótidos dentro de un integrón.

Tabla 5. Cebadores de la PCR.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Referencia
int1.F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	(Nemergut <i>et al.</i> 2004)
int1.R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG	
región conservada 5' CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	(Levesque <i>et al.</i> 1994)
región conservada 3' CS	AAGCAGACT TGACCTGA	

**Fig. 6. Localización de los oligonucleótidos en el integrón.**

Para la amplificación de integrasas y regiones centrales tipo 1 se utilizaron los oligonucleótidos cuya posición se indica en la figura.

Los componentes de las PCR (Tabla 6) así como los protocolos seguidos para la amplificación de las integrasas y regiones centrales correspondientes a los integrones tipo 1 (Tabla 7) se muestran a continuación.

Tabla 6. Componentes de la PCR.

Componentes de la PCR	Volumen o Concentración Final
dNTPs	350 μM
Cebadores	300 nM
Tampón de reacción + MgCl_2	5 μl
DNA	DNA
Polimerasa	0,3 μl
H_2O	hasta 50 μl

Tabla 7. Protocolos de las PCR.

a) Integrinas tipo 1.

Ciclos de PCR	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	35
Anillamiento	55 °C	1 min	
Elongación	72 °C	2 min	
Elongación final	72 °C	10 min	1

b) Regiones conservadas tipo 1.

Ciclos de PCR	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	35
Anillamiento	57 °C	1 min	
Elongación	72 °C	2 min	
Elongación final	72 °C	10 min	1

La observación de los productos de la amplificación de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % - 2 %) en TAE.

Para la purificación de fragmentos de agarosa se usó el kit PCR Purification Kit de Qiagen.

3.5. Ligación y transformación

Los fragmentos amplificados fueron introducidos dentro del vector pGEM-T Easy Vector (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ligaciones se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente. Los productos de ligación se introdujeron por transformación mediante choque térmico en células competentes de *Escherichia coli* TG1 obtenidas por el método de CaCl₂ (Sambrook 2001).

Los transformantes se seleccionaron en placas con 100 µg/mL de ampicilina, 1 mM de IPTG y 50 µg/mL de X-Gal. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas.

Los clones positivos (colonias blancas) fueron seleccionados para la extracción de plásmidos.

3.6. Aislamiento de plásmidos y secuenciación

Los plásmidos procedentes de clones positivos fueron aislados de cultivos O/N de 2 mL usando el kit Miniprep de Qiagen. La presencia de insertos en los plásmidos se comprobó mediante PCR o cortes con enzimas de restricción, observándose seguidamente, mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % - 2 %) en TAE.

Los plásmidos se secuenciaron con oligonucleótidos localizados en zonas que flanquean el inserto: T7 (ATTATGCTGAGTGATATCCC) y SP6 (AAGATATCACAGTGGATTTA) por el Servicio de Secuenciación del Parque Científico, Unidad Genómica de la Universidad Autónoma de Madrid. Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos del NCBI.

3.7. PCR en tiempo real

La cuantificación absoluta de las integrón integrasas tipo 1 presentes en las diferentes muestras de suelos analizadas en este estudio, se realizó mediante PCR en tiempo real.

Se generaron curvas estándares para la detección de *intl* y 16S rRNA. Los fragmentos de *intl1* y 16S rRNA obtenidos por PCR, de 484 pb y 467 pb respectivamente, se clonaron en el plásmido pGEM-T y fueron utilizados como controles positivos.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de *intl1* fueron los mismos que se emplearon para la amplificación de las integrasas tipo 1 descrita con anterioridad. Las secuencias 16S rRNA de Eubacteria fueron amplificadas usando los cebadores universales f331 (TCCTACGGGAGGCAGCAGT) y r797 (TCCTACGGGAGGCAGCAGT).

La PCR en tiempo real fue llevada a cabo en el aparato ABI7300 (Applied Biosystems) usando el siguiente programa de ciclos: 94 °C X 3 minutos, 40 ciclos de 94 °C X 3 segundos, 60 °C X 30 segundos, 72 °C X 1 minuto y el paso final de extensión, 72 °C X 10 minutos.

La medición de cada una de las muestras se hizo por triplicado. El número de copias de *int1* y 16S rRNA fue calculada en base a cada una de las curvas estándares respectivamente, mediante la correlación entre el DNA de partida y el DNA formado durante la fase exponencial (Wright *et al.* 2008), estableciendo una relación entre el número de integrasas encontradas en cada una de las muestras de suelos con la cantidad de microorganismos obtenida por la amplificación del 16S.

3.8. Análisis bioinformático

3.8.1. Análisis de secuencias obtenidas en los diferentes ambientes analizados en el estudio

Las secuencias de integrasas y regiones centrales de los integrones tipo 1 obtenidas por PCR en este estudio, en los distintos ambientes analizados: ambientes contaminados, no contaminados, alejados de la actividad humana y procedente del metagenoma intestinal, fueron comparadas e identificadas, usando NCBI BLAST en su página (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando CLUSTALW2 con el editor Jalview (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), empleando los parámetros establecidos por defecto.

3.8.2. Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de genomas parciales y completos de bacterias

Se investigó la presencia de integrasas tipo 1 o genes *int1* en bases de datos de genomas completos y parciales (Whole Genome Shotgun) ya secuenciados. Se buscaron además los genes *sul1*, *qacEΔ1* y *orf5* en aquellos microorganismos que contenían el gen *int1* con una identidad superior al 50 %.

También se analizaron los entornos genéticos del gen *int1* con el objetivo de ver si se observaban diferencias en la estructura de los integrones tipo 1.

Los sitios o páginas webs consultadas fueron: EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/wgs.html>) y NCBI Genomic BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

3.8.3. Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de metagenomas

Se exploró la presencia de los genes *intl* así como de los genes *sul1*, *qacEΔ1* y *orf5* en bases de datos de metagenomas. Se seleccionaron metagenomas con diferentes orígenes para poder comparar y analizar la presencia de los genes que forman parte de los integrones tipo 1 en diferentes medioambientes.

Se buscaron en las siguientes bases de metagenomas:

1. MG-RAST (<http://metagenomics.nmpdr.org/>)
2. CAMERA (<http://camera.calit2.net/index.shtm>)
3. IMG/M (http://img.jgi.doe.gov/m/doc/about_index.html)
4. GOLD (<http://www.genomesonline.org/>) y NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blast_table.cgi?taxid=Environment&taxidinf=environ_info&selectall)

3.8.4. Búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas

Usando los términos: “*integron integrases uncultured bacterium*”, se realizó una búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas en la base de proteínas de la página del PubMed – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>).

3.8.5. Búsqueda del gen *aadA* en bases de datos de metagenomas y en bacterias no cultivadas

Se exploró la presencia del gen de resistencia *aadA* en las bases de metagenomas mencionadas en el apartado 3.8.3 y en secuencias de bacterias no cultivadas anotadas consultando la base de proteínas del PubMed – NCBI (apartado 3.8.4).

3.8.6. Creación de una base de secuencias de integrasas, de sitios *attC* y programas accesorios para el análisis bioinformático

En colaboración con Javier Tamames, CNB – CSIC, elaboramos una base de datos de secuencias de integrasas, no sólo con *intl*, sino agrupando también otras familias a la que pertenecen el resto de la integrasas. También se confeccionó una base de datos para los sitios *attC* con el objetivo de localizar posibles cassettes génicos en las bases de datos de metagenomas.

Los metagenomas estudiados fueron: metagenoma del intestino humano (AAQK000000000), metagenoma del suelo (AAFX000000000) y de restos de ballenas (AAFZ000000000).

La base de secuencias de integrasas fue comparada con cada uno de los metagenomas mencionados. El programa BLAST (Altschul *et al.* 1990) permitió comparar una base de datos contra otra base de datos. Este procedimiento de búsqueda de homologías permitió encontrar aquellos *contigs* que contenían integrasas. A continuación, se compararon las secuencias flanqueando las integrasas, para estudiar el entorno génico en la que se encontraban. Un programa de visualización gráfica, nos permitió profundizar en el análisis de los resultados ya que podemos observar los tamaños de los *contigs*, la posición de la integrasa en la secuencia comparada, el sentido de los genes encontrados, la puntuación resultante del alineamiento de cada uno de ellos, el borrado del resultado, además de tener acceso al *contig* y a la información de la integrasa de la base de datos con la que se obtuvo el mayor porcentaje de identidad.

Los sitios de recombinación *attC* poseen en sus extremos 7 pares de bases invertidas repetidas e imperfectas cuya secuencia consenso por el extremo 5' es RYYAAC y por el extremo 3' es GTTRRY, donde R puede ser A o G y Y puede ser C o T. El centro de la secuencia no es conservada y puede variar de 57 a 141 pb de longitud (Stokes *et al.* 1997). Se construyó una base de datos con todas las combinaciones posibles de los extremos de los sitios *attC* (16 posibles secuencias para cada extremo). Se buscaron homologías perfectas entre los *contigs* de los metagenomas seleccionados y esta base de datos, buscando la existencia de posibles *attC* en ellos. Una vez obtenido el resultado de la comparación de la base de sitios *attC* con los metagenomas analizados, se analizó el resultado con un programa informático que selecciona solamente aquellas entradas con dos sitios *attC* en los que los extremos fueran

invertidos 100 % idénticos y en los que la longitud entre los extremos de la secuencia no excediera las 180 pb. Posteriormente, se compararon los lados de las secuencias de los sitios *attC* encontrados, buscando los posibles cassettes génicos. El programa de visualización gráfica de los resultados, nos permitió observar los tamaños de los distintos *contigs*, la posición del potencial sitio *attC*, de los cassettes, la puntuación del alineamiento así como realizar operaciones de borrado, acceso al *contig* comparado, etc.

3.9. Búsqueda de genes de resistencia en genotecas procedentes de ambientes extremos

3.9.1. Descripción de las genotecas

Fueron analizadas tres genotecas cedidas por Manuel Ferrer del Instituto de Catálisis (CSIC) construidas en el vector pCC1FOS, en la cepa *E.coli* EPI300, a partir del aislamiento de DNAs procedentes de diferentes ambientes considerados extremos, bien por poseer características muy específicas, entre las que se encuentra las condiciones de temperatura, presión, bien en el caso de la genoteca Múrmansk, por provenir de un ecosistema contaminado.

El nombre de las genotecas (MMK, Anr26 y KB1) se refiere a su localización geográfica (Fig. 7).

La muestra MMK es una muestra de agua superficial que procede de Múrmansk, una ciudad portuaria de Rusia ubicada en el noroeste, cerca de la frontera con Noruega y Finlandia, en la región de Laponia. Múrmansk es el mayor puerto de Rusia en el Ártico, situado a 2.345 kilómetros al sur del Polo Norte, en la desembocadura del río Kola. Las muestras Anr26 y KB1 se tomaron en la interfase de salmuera de las fosas hipersalinas del Mar Mediterráneo: L'Atalante y MEDEE, respectivamente. La fosa L'Atalante se encuentra a 3552 m de profundidad y la fosa MEDEE a 2900 m y se caracterizan por una alta concentración salina y de azufre, ausencia de oxígeno y luz. Junto con éstas fosas también se encuentran Urania, Discovery, entre otras. El muestreo se realizó durante la expedición científica EuroDEEP, a bordo del barco *Urania*, en diciembre del 2007.

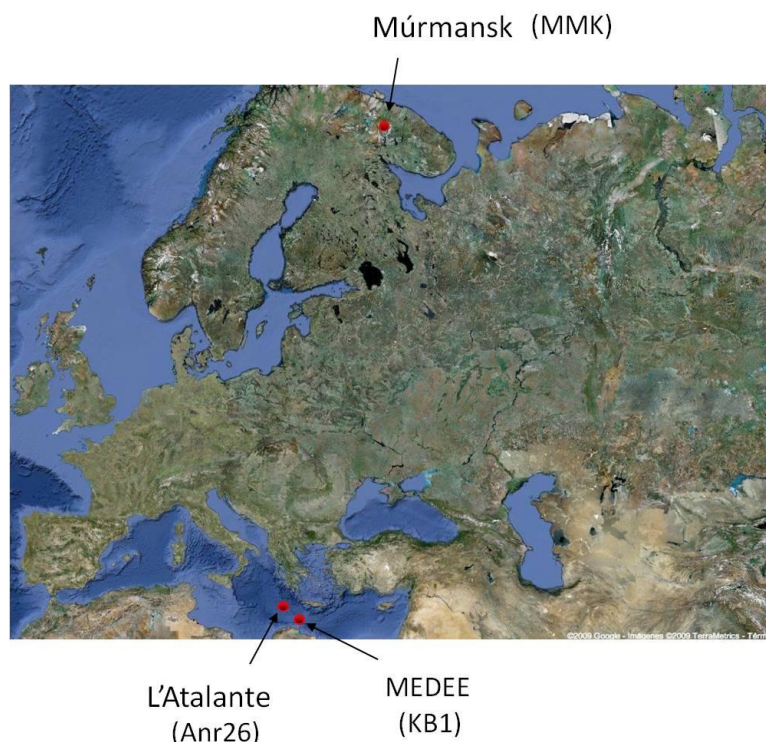


Fig. 7. Localización de cada una de las muestras utilizadas para la construcción de las genotecas.

Las muestras de las genotecas Anr26 y KB1 pertenecen a las fosas marinas L'Atalante y MEDEE situadas en el Mar Mediterráneo. La genoteca MMK es de una muestra de agua del puerto de Múrmansk, Rusia.

3.9.2. Amplificación de las genotecas

En placas cuadradas de 23 X 23 cm con 250 mL de medio LB agar suplementado con 12,5 µg/mL de cloranfenicol (marcador de resistencia del fósido usado en la construcción de las genotecas), se extendieron 500 µL de cada una de las genotecas previamente diluidas 1/100. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas.

Se confeccionaron 3 placas de agar LB con cloranfenicol para la amplificación de cada genoteca. Una vez incubadas las placas se les añadió 10 mL de medio LB líquido para el desprendimiento y arrastre de la biomasa celular.

Finalmente se añadió la misma cantidad de glicerol al 40 % al cultivo recogido para posteriormente alicuotar y guardar las alícuotas a - 70 °C.

3.9.3. Selección de clones resistentes a antibióticos y biocidas

La selección de clones resistentes tanto a antibióticos como a biocidas se hizo usando concentraciones selectivas superiores a la CMI obtenida para la cepa *E. coli* EPI300.

Los antibióticos y biocidas usados para la selección de los clones resistentes se muestran en la Tabla 8. Los antibióticos están agrupados en diferentes familias atendiendo a su mecanismo de acción. Los biocidas estudiados, actualmente constituyen aditivos en formulaciones comerciales como bactericidas o fungicidas.

Se utilizaron placas cuadradas de 23 X 23 cm con 250 mL de medio MH agar con cada concentración de antibiótico y biocida. Se extendieron 500 μ L de las alícuotas de las genotecas que previamente fueron amplificadas, como se ha explicado con anterioridad. Se hicieron 3 placas por concentración y genoteca probada. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas.

Se seleccionaron 10 clones para cada concentración testada y posteriormente se crecieron en placas con medio LB agar más cloranfenicol (marcador de resistencia del fósido), para verificar la presencia del fósido dentro de cada uno de los clones seleccionados.

Tabla 8. Antibióticos y biocidas utilizados en el estudio.

	Familia de antibióticos	Antibióticos utilizados	Mecanismo de acción
Antibióticos	Aminoglucósidos	Amikacina, Kanamicina	Inhibe la síntesis proteica actuando sobre la subunidad 30S de los ribosomas
	Cefalosporinas	Ceftazidima	Interfiere en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular
	Quinolonas	Ácido nalidíxico, Norfloxacin, Ofloxacin	Bloquea la actividad de la subunidad A de la DNA girasa
Biocidas	Tipo de biocida	Biocidas utilizados	Mecanismo de acción
	Químicos	Triclosan Benzalconio Hexaclorofeno	Acción a nivel de la membrana celular

Los clones resistentes a antibióticos y biocidas que crecieron en placas con cloranfenicol fueron guardados en glicerol 20 % a - 70 °C para su conservación en una placa de congelación de 96 pocillos. Primeramente, se inocularon, usando palillos estériles, los clones seleccionados en placas de 96 pocillos con 100 µL de medio LB líquido con cloranfenicol (de la fila A - G), por duplicado. En la fila H de la placa de 96 pocillos se sembró la cepa de *E. coli* EPI300 en 100 µL de medio LB líquido, para ser utilizada como control junto con los clones seleccionados en futuros ensayos. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas. Posteriormente se diluyó la placa, empleando un replicador, en medio LB líquido y se creció nuevamente, incubándose de la misma manera. A esta nueva placa se le añadió, en cada pocillo, 35 µL de glicerol 80 % pipeteando de arriba hacia abajo cuidadosamente. A continuación, se tomaron de esta última placa, 40 µL de cultivo más glicerol y se le añadió a una placa de congelación de 96 pocillos con 160 µL de medio LB líquido con cloranfenicol (fila H medio LB líquido sin antibiótico), pipeteando de arriba hacia abajo lentamente para no contaminar el resto de la placa. Cada placa se selló con parafilm y se guardó a - 70 °C.

3.9.4. Determinación de la CMI para los clones seleccionados

Para la determinación de la CMI de los clones seleccionados se inoculó, a partir de la placa de congelación confeccionada en el apartado anterior y usando un replicador, una placa de 96 pocillos con medio MH líquido con cloranfenicol. La placa se incubó O/N a 37 °C. Se prepararon placas cuadradas de 12 X 12 cm con 50 mL de medio MH agar con las concentraciones de antibióticos y biocidas (Tabla 8). Las concentraciones probadas fueron las de la CMI de la cepa *E. coli* EPI300 más concentraciones superiores. Además de los antibióticos reflejados en la tabla se probaron otros antibióticos de importancia clínica, para ver si se observaba un aumento en la CMI respecto a la cepa *E. coli* EPI300. Los antibióticos analizados fueron: polimixina, tetraciclina, imipenem y gentamicina.

Las CMIs fueron confirmadas por triplicado. Una placa con medio LB líquido con cloranfenicol inoculada de igual forma, a partir de la placa de congelación, se utilizó como control del crecimiento de los clones seleccionados. Otro control utilizado fue el crecimiento, en una placa con medio LB líquido sin antibiótico, tanto de los clones seleccionados como de la cepa *E. coli* EPI300.

3.9.5. Comprobación del fenotipo de resistencia

De entre los clones seleccionados, se caracterizaron con más detalle aquellos que presentaron mayor resistencia.

3.9.5.1. Extracción de fósmidos

Se extrajeron los fósmidos de los clones con el fenotipo de resistencia más marcado. A partir de los gliceroles de cada clon, se inocularon matraces que contenían 5 mL de medio LB líquido con cloranfenicol y 1 mM de IPTG por aproximadamente 8 horas a 37 °C con agitación. Posteriormente se inoculó un matraz de 2 L, con 500 mL de medio LB líquido con cloranfenicol y 1 mM de IPTG, con 1 mL del pre-cultivo (dilución 1/500), incubándose con fuerte agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 16 horas, a 37 °C. Los pasos siguientes de la extracción se realizaron utilizando el kit Large-Construct de QIAGEN. La concentración de los fósmidos se midió en un espectrofotómetro.

3.9.5.2. Confirmación del fenotipo de resistencia

Los fósmidos fueron reintroducidos por transformación en células competentes de *E. coli* TG1 y JM109 (Sambrook 2001) y seleccionados en placas de LB agar con 12,5 µg/mL de cloranfenicol, 1 mM de IPTG y 50 µg/mL de X-Gal. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas.

Se seleccionaron 5 clones positivos (colonias blancas) que se pasaron a placas de LB agar con cloranfenicol. Los clones re-transformados fueron guardados en glicerol al 20 %, a – 70 °C para su conservación.

3.9.5.3. Fenotipo de resistencia-sensibilidad

Se realizaron ensayos de difusión en disco usando la batería de antibióticos reflejados en la Tabla 9, con el objetivo de averiguar si los clones mostraban patrones de resistencia o sensibilidad diferenciales en comparación con la cepa silvestre.

Tabla 9. Antibióticos utilizados para medir la susceptibilidad por difusión en disco.

Antibióticos	
Amikacina	Levofloxacin
Aztreonam	Meropenem
Cefepime	Minociclina
Cefoxitina	Ácido Nalidixico
Ceftazidima	Netilmicina
Cefuroxima	Norfloxacin
Cloranfenicol	Ofloxacin
Ciprofloxacina	Oxacillina
Cloxacillina	Polimixina
Colistina	Espectinomicina
Eritromicina	Estreptomycin
Fosfomicina	Tetraciclina
Gentamicina	Tigeciclina
Imipenem	Tobramicina
Kanamicina	Trimetropina
Latamoxef	Sulfametoxazol/Trimetropin

A partir de los glicerol de los clones con acentuado fenotipo de resistencia, se inocularon matraces con medio LB líquido más cloranfenicol a 37 °C, O/N. En placas de MH agar con 1 mM de IPTG se sembraron 100 µL de una dilución 1/1000 de cada cultivo. Se dejaron secar las placas y a continuación se colocaron los discos de los antibióticos indicados en la Tabla 9. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas.

El disco de cloranfenicol fue utilizado como control por la presencia del marcador de resistencia a cloranfenicol de los fósmodos. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos al día siguiente comparándose cada uno con su cepa silvestre correspondiente.

Aquellos clones que mostraron resistencia al antibiótico en el cual había sido seleccionado, fueron confirmados como clones resistentes hallados en las genotecas procedentes de ambientes extremos. Para la comprobación de los clones resistentes a biocidas se procedió a realizar diluciones seriadas desde 0,007 mg/mL de concentración hasta 1 mg/mL. Se adicionaron 20 µL de cada dilución a discos de papel de filtro previamente esterilizados y se dejaron secar durante aproximadamente 15 min. En placas de MH agar con IPTG se extendieron los clones y una vez secas las placas, se colocaron los discos de papel de filtro con diferente concentración del biocida a probar. Las placas se incubaron a 37 °C, 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición comparándose con la cepa silvestre *E. coli* EPI300. Los clones re-

transformados que presentaron una mayor resistencia a los biocidas respecto a la cepa silvestre, fueron confirmados como positivos y enviados a secuenciar.

3.9.5.4. Secuenciación de los fósmidos

Los fósmidos correspondientes a los clones que mantuvieron el fenotipo de resistencia luego de ser reintroducidos en otra cepa, fueron enviados a secuenciar a Life Sequencing. Cada uno de ellos fue concentrado en columnas Amicon® Ultra-0.5 100K, Millipore, para lograr una concentración y volumen final adecuados para la secuenciación.

La visualización de los fósmidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en TAE, a 20 V, a 4 °C, O/N. Se observó también el patrón de restricción de cada uno con las enzimas EcoRI y HindIII, las cuales cortan a cada lado del inserto, liberándolo.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Aislamiento del DNA total en muestras ambientales y pre-amplificación

Aproximadamente el 99 % de los microorganismos presentes en los ecosistemas naturales no son cultivables (Streit and Schmitz 2004; Venter 2006). El uso de técnicas metagenómicas independientes de cultivo, nos ofrece la oportunidad de estudiar un mundo hasta hace poco desconocido por las limitaciones de los métodos basados en cultivo y nos permite examinar a fondo diferentes ecosistemas. En nuestro trabajo, nos propusimos estudiar diferentes ambientes naturales en la búsqueda de integrones tipo 1, importantes, desde el punto de vista clínico, en la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos.

Teniendo en cuenta, que la cantidad de DNA metagenómico nunca es la ideal porque influyen muchos factores en la extracción que nos impiden tener una alta concentración del mismo, en nuestro trabajo procedimos a realizar una pre-amplificación isotérmica de las muestras antes de la PCR.

Esta pre-amplificación es una amplificación no específica que usa oligonucleótidos aleatorios y que nos permite disminuir los efectos de inhibidores de la PCR, como ácidos húmicos y exopolisacáridos, usualmente presentes tras la extracción del DNA de las muestras ambientales. También permite aumentar el número de copias en la muestra lo que abre la posibilidad de aumentar la concentración de DNA obtenida ya que en ocasiones ésta es baja (Gonzalez *et al.* 2005; Abulencia *et al.* 2006).

Todas las muestras fueron pre-amplificadas obteniéndose concentraciones que variaban entre 200 y los 600 ng/μL y con una relación 260/280 mayor de 1,6.

4.2. Amplificación de integrasas y regiones centrales tipo 1 en muestras procedentes de ambientes naturales

4.2.1. Integrasas tipo 1 en ambientes naturales contaminados y no contaminados

Se encontraron integrasas tanto en los ambientes contaminados estudiados como en los no contaminados. Se testaron 300 clones de posibles integrasas obtenidas de las muestras no contaminadas y 300 clones procedentes de las muestras contaminadas con lindano y arsénico. De los 300 clones de las muestras no contaminadas analizadas, se secuenciaron 250 de los que se obtuvieron 50 secuencias de integrasas, de las cuales 15 son diferentes unas de otras. Las secuencias de los otros clones secuenciados no correspondían a secuencias de integrasas.

De los 300 clones testados de las muestras no contaminadas fueron secuenciados 150, obteniéndose un total de 25 secuencias de integrasas de las cuales 13 son diferentes entre sí. El resto de las secuencias obtenidas no pertenecían a integrasas.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que encontramos una variedad de integrasas distribuidas en los medioambientes naturales (no clínicos) diferentes analizados. No hallamos una diferencia clara en el número de integrasas obtenidas en los ambientes contaminados y no contaminados. El hecho de encontrar una diversidad de integrasas en ambos tipos de ambientes, nos hace pensar en una gran distribución de elementos de captura génica en los ecosistemas naturales.

El resultado detallado de las integrasas obtenidas en las muestras contaminadas y no contaminadas se resume en la Tabla 10 y en la Tabla 11.

Todas las integrasas obtenidas muestran porcentajes de identidad mayores del 60 % con integrasas previamente descritas en las bases de datos consultadas. Las integrasas más representativas dentro de cada ambiente están destacadas en color rojo.

Tabla 10. Integrasas en ambientes contaminados.

Ambiente	Integrasas	Número de secuencias	Número de acceso, Definición
Contaminados	Lind1	17 (484 pb)	YP_003674799.1, integrón integrasa [<i>Methylothermobacter</i> sp. 301]. (81 % de identidad)
	Lind2	1 (482 pb)	YP_003691716.1, integrón integrasa [<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i> AHT2]. (75 % de identidad)
	Lind3	16 (484 pb)	ACS73664.1, <i>intl</i> [bacteria no cultivada]. (100 % de identidad)
	Lind4	2 (484 pb)	YP_003691716.1, integrón integrasa [<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i> AHT2]. (84 % de identidad)
	Lind5	2 (484 pb)	ABD62548.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (87 % de identidad)
	Lind6	1 (490 pb)	ABD62682.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (78 % de identidad)
	As1	1 (485 pb)	AAP37603.1, <i>intl</i> [bacteria no cultivada]. (79 % de identidad)
	As2	2 (495 pb)	ABD62689.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (79 % de identidad)
	As3	1 (298 pb)	ABD62687.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (74 % de identidad)
	As4	1 (502 pb)	ABD62695.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (85 % de identidad)
	As5	1 (519 pb)	ACM88780.1 integrasa [bacteria no cultivada]. (77 % de identidad)
	As6	2 (484 pb)	ABD62563.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (85 % de identidad)
	As7	1 (485 pb)	ABD62682.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (77 % de identidad)
	As8	1 (485 pb)	ACS73587.1, <i>intl</i> [bacteria no cultivada]. (85 % de identidad)
	As9	1 (522 pb)	ACP39548.1, integrón integrasa [bacteria no cultivada]. (72 % de identidad)

Tabla 11. Integrasas en ambientes no contaminados.

Ambiente	Integrasas	Número de secuencias	Número de acceso, Definición
No contaminados	Ext1	2 (493 pb)	ACM88794.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (68 % de identidad)
	Ext2	2 (484 pb)	ABD62687.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (87 % de identidad)
	Ext3	1 (506 pb)	ABD62623.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (71 % de identidad)
	Ext4	5 (480 pb)	ABD62690.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (92 % de identidad)
	Ext5	1 (538 pb)	ACM88780.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (81 % de identidad)
	Ext6	2 (482 pb)	ABD62559.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (81 % de identidad)
	Ext7	3 (484 pb)	ABD62630.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (90 % de identidad)
	Ext8	1 (484 pb)	ABD62687.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (77 % de identidad)
	Ext9	1 (484 pb)	ABD62543.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (81 % de identidad)
	Ext10	3 (484 pb)	ABD62645.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (96 % de identidad)
	Ext11	2 (485 pb)	ACS73664.1, <i>intl</i> [bacteria no cultivada]. (99 % de identidad)
	Ext12	1 (484 pb)	ACM88776.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (90 % de identidad)
	Ext13	1 (484 pb)	ACM88782.1, integrasa [bacteria no cultivada]. (79 % de identidad)

Las integrasas obtenidas tanto en ambientes contaminados como no contaminados son secuencias nuevas que en general no corresponden a integrasas tipo 1, a pesar de que los oligonucleótidos utilizados estaban dirigidos a encontrar integrasas de este tipo. Solamente encontramos una integrasa *intl1* en las muestras contaminadas (Lind3) secuenciada 16 veces y en las muestras no contaminadas (Ext11), 2 veces secuenciada. El resto de las

integrasas presentan elementos comunes con integrasas ya descritas en su mayoría pertenecientes a bacterias no cultivadas.

4.2.2. Regiones centrales tipo 1 en ambientes naturales contaminados y no contaminados

Las regiones centrales amplificadas en las muestras de ambientes naturales contaminados y no contaminados, pueden observarse en la Tabla 12 y la Tabla 13.

Un total de 300 clones, pertenecientes a regiones centrales amplificadas en las muestras contaminadas, y 300 clones para las muestras no contaminadas, fueron testados.

De las muestras contaminadas (Tabla 12) se secuenciaron 115 clones, obteniéndose 99 secuencias de posibles cassettes génicos, 24 de ellos diferentes. Podemos resaltar 56 secuencias (color rojo) donde se reconocen las regiones conservadas 5', 3' o ambas, propias de los integrones tipo 1, por lo que en estos casos podemos decir que los cassettes asociados forman parte efectivamente de la estructura de un integrón. De estos cassettes, destacamos la presencia de los genes de resistencia *aadA1* y *aac(6')-Ib-cr*, que confieren resistencia a estreptomicina y espectinomicina, y a aminoglucósidos y fluoroquinolonas, respectivamente. También encontramos 14 secuencias de integrones vacíos. De ellos, en 13 secuencias se detectan las regiones conservadas 5' y 3' y en 1 cassette, se observa el gen *qac*, de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio, junto al extremo 5' por lo que también corresponde a un integrón vacío ya que el gen *qac* se encuentra a continuación de la región variable (donde se localizan los cassettes) en la estructura de los integrones tipo 1. En 16 secuencias no detectamos homología con secuencias depositadas en las bases de datos. Estas secuencias podrían constituir potencialmente cassettes no descritos, con zonas de recombinación diferentes a las conocidas hasta el momento.

Tabla 12. Regiones centrales en ambientes contaminados.

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
Contaminados	2 (291 pb)	YP_003199892.1, transportador de resistencia de drogas, subfamilia EmrB/QacA [<i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233]. (50 % de identidad)	Transportador de resistencia de drogas, subfamilia EmrB/QacA
	6 (917 pb)	GU987053, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium cepa ST256 clase 1 integrón aminoglucósido-3"-adeniltransferasa gen (<i>aadA1</i>). (100 % de identidad)	5`CS, <i>attI</i> + <i>aadA1</i> + <i>attC</i> , 3`CS
	1 (162 pb)	GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad).	5`CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	1 (339 pb)	ZP_01875019, oxidoreductasa, cadena corta dehidrogenasa/reductasa [<i>Lentisphaera araneosa</i> HTCC2155]. (80 % de identidad)	Oxidoreductasa
	11 (558 pb)	XP_002817660, cAMP-dependiente de proteína quinasa tipo I-beta subunidad reguladora, [<i>Pongo abelii</i>]. (71 % de identidad)	cAMP dependiente de proteína quinasa
	2 (394 pb)	BX842653, proteína de la pared celular. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> , genoma completo, cepa HD100. (50 % de identidad)	Proteína de la pared celular
	1(273 pb)	YP_890530, citocromo P450 107B1 [<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155]. (55 % de identidad)	Citocromo
	1(340 pb)	XP_002477883, proteína extracelular rica en cisteína, [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]. (57 % de identidad) GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad)	Proteína extracelular rica en cisteína + 5`CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
Contaminados	1(371 pb)	YP_001423562, proteína hipotética citosólica [<i>Coxiella burnetii</i> Dugway 5J108-111]. (58 % de identidad) GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad)	Proteína hipotética citosólica + 5`CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	18 (915 pb)	GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad).	5`CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	2(792 pb)	CBL01534, proteína de canal mecanosensible de alta conductancia [<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> SL3/3]. (60 % de identidad)	Proteína de canal mecanosensible de alta conductancia
	1(484 pb)	CP001068, proteína de función desconocida DUF47, <i>Ralstonia pickettii</i> 12J chromosome 1, secuencia completa. (100 % de identidad). AF294653, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> INT1 gen (Int1), y genes OXA-31 (Bla _{oxA31}), AADA2a (AadA2a), and CMLA6 (CmlA6). (98 % de identidad)	Proteína de función desconocida DUF47 + integrasa Int1
	2 (357 pb)	CP001068, proteína de función desconocida DUF47, <i>Ralstonia pickettii</i> 12J chromosome 1, secuencia completa. (100 % de identidad)	Proteína de función desconocida DUF47
	1 (651 pb)	XP_002113617, proteína hipotética TRIADDRAFT_57225 [<i>Trichoplax adhaerens</i>]. (32 % de identidad).	Proteína hipotética
	1 (790 pb)	HM569736, <i>Enterobacter cloacae</i> cepa K-317 clase I integrón Int1 gen (int1). (99 % de identidad)	Integrasa clase 1 + 5`CS, <i>attI</i> , integrón sin cassette + 3`CS
	12 (695 pb)	HM569736, <i>Enterobacter cloacae</i> cepa K-317 clase I integrón Int1 gen (int1). (98 % de identidad)	5`CS, <i>attI</i> , integrón sin cassette + 3`CS

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
Contaminados	1 (696 pb)	CP001068, proteína de función desconocida DUF47, <i>Ralstonia pickettii</i> 12J chromosome 1, secuencia completa. (96 % de identidad). GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (98 % de identidad)	Proteína de función desconocida DUF47 + 5'CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	1 (424 pb)	AJ867811, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clase I resistencia integrón InPSN18, aislamiento bpoe636. (91 % de identidad)	5'CS, <i>attI</i> + <i>qac</i> cassette
	1 (619 pb)	YP_003613663, bactoprenol glucosiltransferasa [<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047]. (54 % de identidad) GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad)	Bactoprenol glucosiltransferasa + 5'CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	1 (564 pb)	ZP_07045091, proteína hipotética CTS44_12884 [<i>Comamonas testosteroni</i> S44]. (59 % de identidad) GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (99 % de identidad)	Proteína hipotética + 5'CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	1 (980 pb)	GU987053, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain ST256 clase 1 integrón aminoglucósido-3"-adeniltransferasa gen (<i>aadA1</i>). (99 % de identidad)	5'CS, <i>attI</i> + <i>aadA1</i> cassette (resistencia a estreptomicina y espectinomycin) + 3'CS
	1 (470 pb)	XP_001514185, proteína hipotética [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>]. (44 % de identidad)	Proteína hipotética
	1 (363 pb)	AAP03426, proteína hipotética [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]. (33 % de identidad)	Proteína hipotética
	6 (962 pb)	ABS86619, proteína de la cápside [fago no cultivado]. (72 % de identidad)	Proteína de la cápside

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
Contaminados	6 (679 pb)	CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, sistema tipo ABC de transporte de urea, proteína periplásmica. (95 % de identidad)	Sistema tipo ABC de transporte de urea, proteína periplásmica
	2 (856 pb)	CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina/antibiótico. (85 % de identidad)	Proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico
	5 (990 pb)	GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad)	5'CS, attI + aac(6')-Ib-cr cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	1 (699 pb)	CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina/antibiótico. (86 % de identidad).	Proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico
	1 (1090 pb)	CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina/antibiótico. (85 % de identidad). FN396377, Integrón clase I bacteria no cultivada que contiene gen dhfrA12, aislado OD 24. (100 % de identidad)	Proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico + 3'CS que contiene gen dhfrA12 (resistencia a trimetropina)
	2 (923 pb)	GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (100 % de identidad) CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico. (85 % de identidad)	aac(6')-Ib-cr cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas) + 5'CS, attI + proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
Contaminados	1 (992 pb)	CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico. (85 % de identidad). GU906294, <i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa C1911 clase 1 integrón, secuencia parcial. (98 % de identidad)	Proteína de secreción transportadora ABC bacteriocina / antibiótico + 5'CS, <i>attI</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i> cassette (resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas)
	2 (273 pb)	YP_890530, citocromo P450 107B1 [<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155]. (73 % de identidad)	Citocromo
	2 (386 pb)	ZP_01048898, proteína hipotética MED134_05244 [<i>Dokdonia donghaensis</i> MED134]. (47 % de identidad)	Proteína hipotética
	1 (417 pb)	FJ172373, Bacteria no cultivada clon BF7_C6 clase 1 integrón genes <i>qacH</i> y <i>aadA</i> . (96 % de identidad)	<i>attC</i> + <i>aadA</i> cassette (resistencia a estreptomicina y espectinomicina)
	16 (225-261 pb)	No homología	No homología

En las muestras no contaminadas (Tabla 13), por su parte, se secuenciaron 120 clones resultando en 7 secuencias de posibles cassettes diferentes. En 66 secuencias se reconocen las regiones conservadas 5', 3' o ambas (color rojo) que forman parte de la estructura de los integrones tipo 1. De igual forma que en las muestras contaminadas, aparecen integrones con el cassette de resistencia a estreptomicina y espectinomicina, *aadA1*. También detectamos integrones con proteínas hipotéticas asociadas.

En las muestras no contaminadas también encontramos secuencias en las que no se reconocen los extremos 5' y 3' de los integrones. Estas secuencias, al igual que aquellas en las que no pudimos detectar homología con secuencias depositadas en las bases de datos, podrían ser potencialmente cassettes de un tipo diferente a los descritos hasta el momento, ya que los sitios de recombinación son regiones que varían en tamaño, sólo conservando sus extremos repetidos invertidos, y por tanto son secuencias variables que podrían estar aún sin anotar en las bases de datos consultadas. También podría ser que el tamaño de la secuencia no nos hubiera permitido localizar estas zonas.

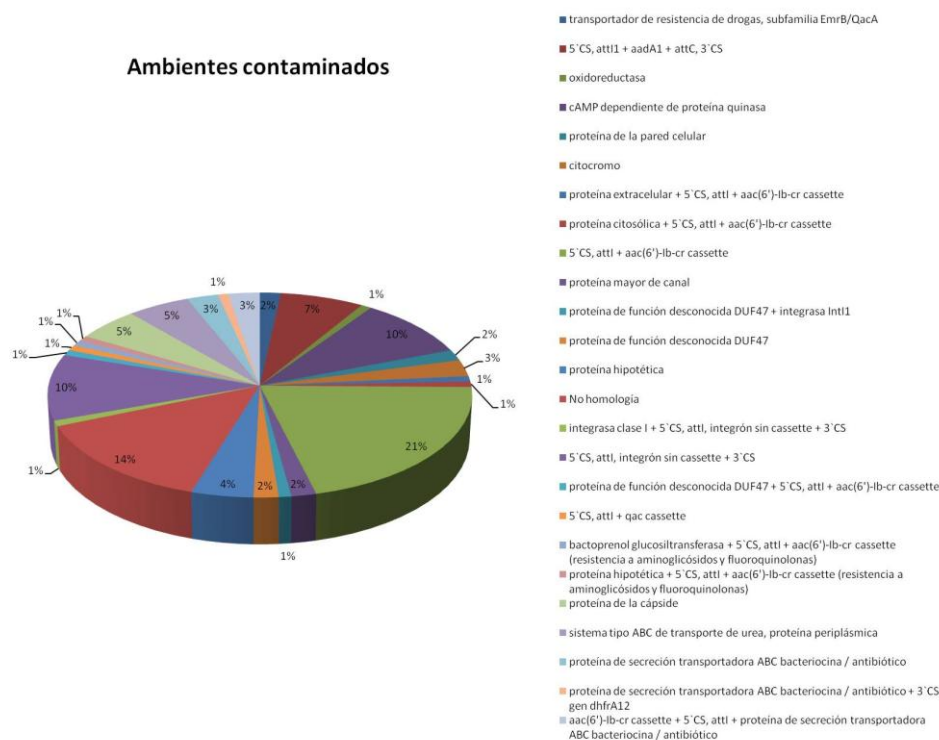
Tabla 13. Regiones centrales en ambientes no contaminados.

Ambiente	Secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
No contaminados	27 (996 pb)	GU987053, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium cepa ST256 clase 1 integrón aminoglucósido-3"-adeniltransferasa gen (aadA1). (93 % de identidad)	5`CS, attI + aadA1 cassette (resistencia a estreptomicina y espectinomicina) + 3`CS attC
	4 (684 pb)	EEH05124, aldehído dehidrogenasa [Ajellomyces capsulatus G186AR]. (58 % de identidad)	Aldehído dehidrogenasa
	9 (416 pb)	YP_001619959, proteína de unión a ATP, sistema de transporte espermidina / putrescina [Sorangium cellulosum]. (50 % de identidad)	Proteína de unión a ATP, sistema de transporte espermidina / putrescina
	12 (417 pb)	ZP_05515119, proteína hipotética ShygA5_17282 [Streptomyces hygrosopicus ATCC 53653]. (33 % de identidad)	Proteína hipotética
	21 (505 pb)	CP001965.1, proteína hipotética Sideroxydans lithotrophicus ES-1, genoma completo. (72 % de identidad). FJ377595.1, Bacteria no cultivada clon ib47 integrón integrasa gen (intl). (97 % de identidad)	5`CS, attI + proteína hipotética
	18 (308 pb)	XP_002594713.1, proteína hipotética BRAFLDRAFT_224193 [Branchiostoma floridae]. (50 % de identidad). EU435338.1, Bacteria no cultivada clon GC_Control_Microcosm_06 cassette, secuencia parcial. (95 % de identidad)	5`CS, attI + proteína hipotética + 3`CS attC
	7 (413 pb)	EFN86430.1 proteína hipotética EAI_05268 [Harpegnathos saltator]. (49 % de identidad)	Proteína hipotética
	22 (143-280 pb)	No homología	No homología

En la Fig. 8 se observa un gráfico con las regiones centrales diferentes obtenidas en los ambientes contaminados y no contaminados estudiados. En el caso de los ambientes contaminados, la mayor representación en la muestra es del cassette *aac(6')-Ib-cr* de resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas con un porcentaje del 21 % seguido de las secuencias de los integrones sin cassettes (vacíos) con un 10 %. El cassette *aadA1* de resistencia a estreptomicina y espectinomicina representa un 7 % en las muestras contaminadas.

En las muestras no contaminadas observamos menos variedad en los tipos de regiones centrales o posibles cassettes encontrados. No obstante, podemos destacar en los resultados obtenidos, la presencia de proteínas hipotéticas asociadas a los integrones. Estas proteínas podrían ser importantes en cuanto a su función, debido al hecho de estar relacionadas con unidades de reclutamiento o captura de genes, como son los integrones, los cuales a su vez, podrían estar vinculados con elementos de movilidad que le permitan su transferencia entre los diferentes microorganismos que forman el ecosistema. Una bacteria con un integrón, puede poseer una ventaja frente a aquellas que carecen de éste, por lo que, las proteínas hipotéticas encontradas dentro de la estructura de los integrones, podrían ofrecer a los microorganismos una mayor capacidad adaptativa en el ecosistema, relacionada quizás, con la supervivencia y la colonización.

Ambientes contaminados



Ambientes no contaminados

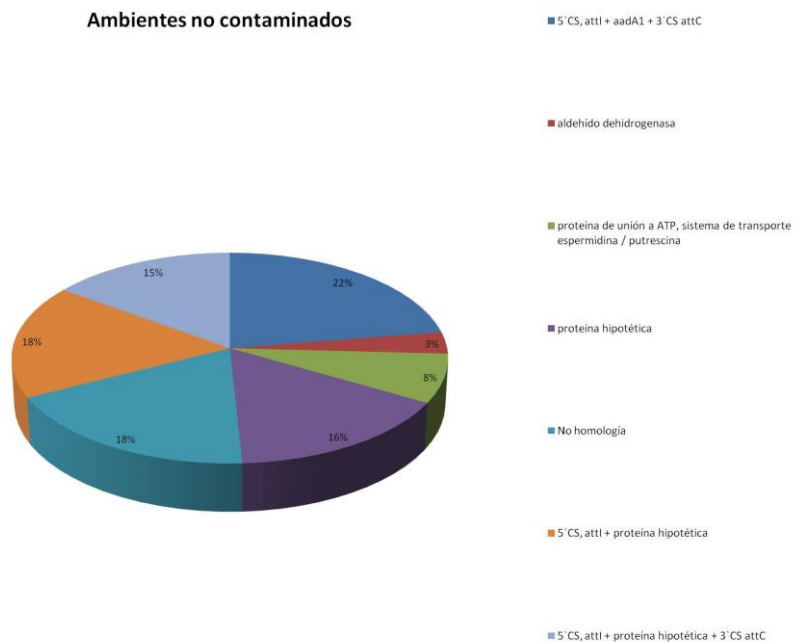


Fig. 8. Tipos de regiones centrales encontradas en los ambientes contaminados y no contaminados.

En las muestras contaminadas, el cassette *aac(6')-Ib-cr* es el mayormente representado con un 21 %, seguido de los integrones vacíos (10 %) y el cassette *aadA1* (7 %). En las muestras no contaminadas, el mayor porcentaje es para el cassette *aadA1* y las secuencias sin similitud descrita en las bases de datos comparadas.

4.2.3. Integrasas y regiones centrales tipo 1 en un ambiente extremo: Urania

En la Tabla 14 se muestran las integrasas obtenidas en este ambiente. Se testaron 150 clones de posibles integrasas, de los cuales se secuenciaron un total de 69 clones. De estos 69 clones secuenciados se obtuvieron finalmente 29 secuencias de integrasas de las cuales, 12 secuencias son integrasas nuevas y diferentes entre sí. Las secuencias de los otros clones secuenciados no correspondían a integrasas.

Tabla 14. Integrasas amplificadas en la muestra Urania.

Integrasas	Número de secuencias	Número de Acceso, Descripción
U1	1 (95 pb)	AB355133, gen parcial, integrón integrasa, bacteria no cultivada. (100 % de identidad)
U2	1 (485 pb)	ABD62687, integrasa, bacteria no cultivada. (65 % de identidad)
U3	1 (485 pb)	AAP37603, <i>intl</i> , bacteria no cultivada. (83 % de identidad)
U4	1 (490 pb)	ABD62628, integrasa, bacteria no cultivada. (72 % de identidad)
U5	1 (492 pb)	ACP39553, integrón integrasa, microorganismo no cultivado. (57 % de identidad)
U6	2 (319 pb)	ABD62605, integrasa, bacteria no cultivada. (51 % de identidad)
U7	3 (484 pb)	ABD62599, integrasa, bacteria no cultivada. (58 % de identidad)
U8	3 (485 pb)	ABD62698, integrasa, bacteria no cultivada. (68 % de identidad)
U9	3 (502 pb)	ABD62693, integrasa, bacteria no cultivada. (59 % de identidad)
U10	4 (512 pb)	BAF75922, integrón integrasa, bacteria no cultivada. (69 % de identidad)
U11	4 (902 pb)	YP_002317699.1, <i>intl</i> integrasa, <i>Acinetobacter baumannii</i> AB0057. (99 % de identidad)
U12	5 (485 pb)	ABD62599, integrasa, bacteria no cultivada. (70 % de identidad)

Estas 12 integrasas halladas en Urania son nuevas, diferentes y presentan dominios comunes con integrasas descritas previamente. La mayoría de ellas corresponden a bacterias que no han sido cultivadas y comparten una identidad superior al 50 %. La integrasa U11 es una integrasa tipo 1 (*intl1*). Las integrasas más representativas dentro de la muestra Urania están destacadas en rojo.

En la Fig. 9 podemos ver el alineamiento con las secuencias de proteínas de cada una de las integrasas obtenidas junto con la integrasa tipo 1 (*intl1*). Sólo se muestra en el alineamiento la zona de mayor coincidencia entre todas las integrasas obtenidas y la integrasa tipo 1. En el alineamiento en base a la secuencia aminoacídica se pueden localizar fácilmente las zonas que comparten o se conservan entre las diferentes integrasas encontradas y la integrasa tipo 1. Del mismo modo podemos ver las diferencias entre las distintas secuencias comparadas. En la Fig. 10 podemos ver el árbol de identidades obtenido del alineamiento de las secuencias de integrasas secuenciadas en Urania.

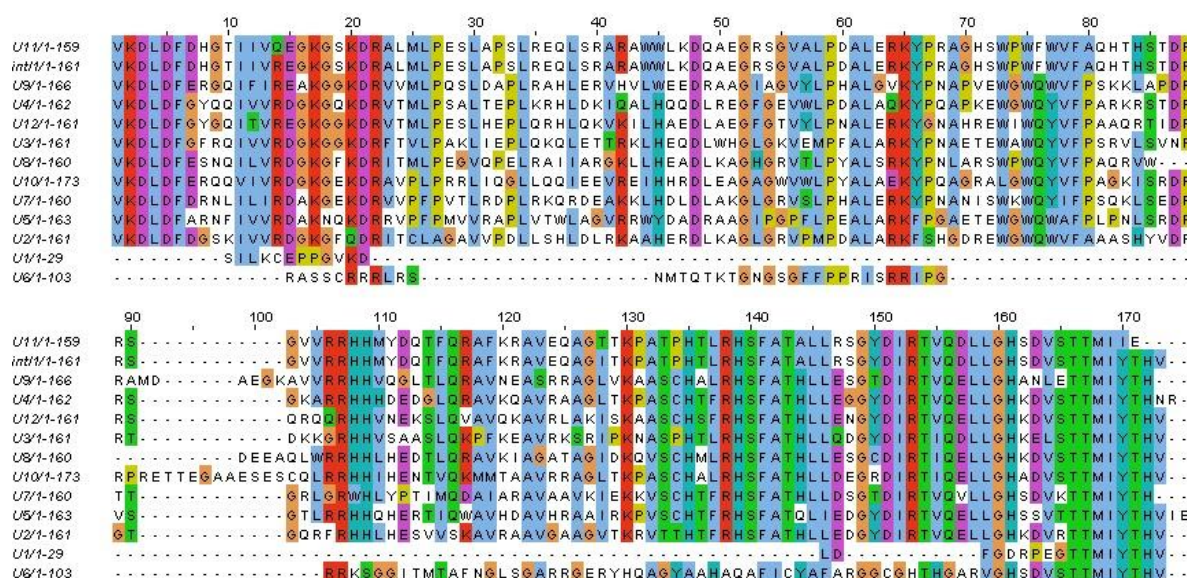


Fig. 9. Alineamiento de secuencias de proteínas en la muestra Urania.

Cada aminoácido está coloreado con un color diferente. El alineamiento de proteínas entre las distintas integrasas e *intl1* es bastante conservado. Las zonas de mayor coincidencia con la integrasa tipo 1 se encuentran en la parte inicial, central y final de las secuencias amplificadas.

Observando el árbol de identidades derivado del alineamiento de las integrasas en la muestra Urania, se puede decir que no hay agrupamientos específicos, lo que indica que las integrasas no son filogenéticamente cercanas, con excepción de la integrasa denominada U11. La integrasa U11 es una integrasa tipo 1 por lo que se coloca, lógicamente, más cerca de la integrasa *intl1*.

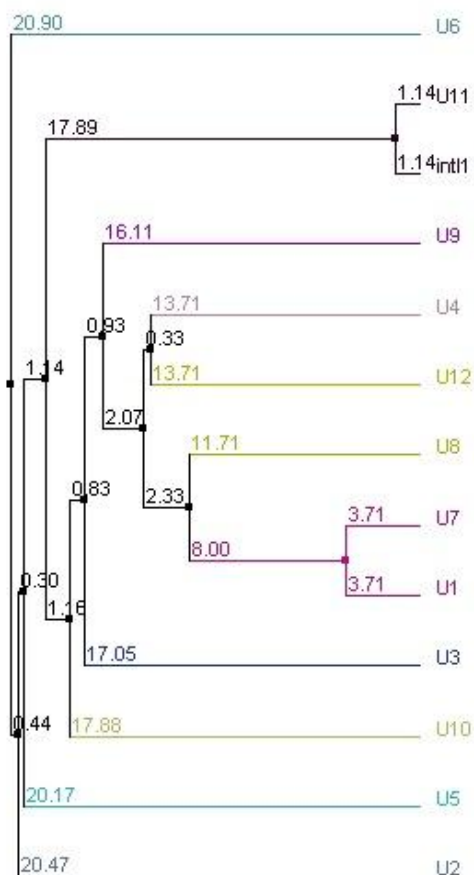


Fig. 10. Árbol de identidades obtenido del alineamiento de proteínas en la muestra Urania.

No se observan agrupamientos de las integrasas en la muestra Urania. La integrasa U11 es una integrasa tipo 1 y por tanto se sitúa más cerca de la *intl1*.

Las regiones centrales secuenciadas en Urania buscando los posibles cassettes asociados a las integrasas en la estructura del integrón, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Regiones centrales secuenciadas en *Urania*.

Número de secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
1 (119 pb)	YP_001898763, proteína con función desconocida DUF47 [<i>Ralstonia pickettii</i> 12J]. (97 % de identidad)	Proteína con función desconocida DUF47
1 (136 pb)	YP_003084915, selenocisteína sintasa (seril-tRNASer selenio transferasa) [<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053]. (58 % de identidad)	Selenocisteína sintasa
1 (219 pb)	YP_003391554, región catalítica de la integrasa [<i>Spirosoma linguale</i> DSM 74]. (79 % de identidad)	Región catalítica de la integrasa
1 (287 pb)	ZP_01048875, relacionado con proteína OmpA [<i>Dokdonia donghaensis</i> MED134]. (56 % de identidad)	Porina
1 (310 pb)	YP_001096552, metil-coenzima M reductasa, proteína D [<i>Methanococcus maripaludis</i> C5]. (32 % de identidad)	Metil-coenzima M reductasa
1 (345 pb)	FN396377, Bacteria no cultivada, integrón parcial clase 1 que contiene el gen dhfrA12, aislamiento OD 24. (100 % de identidad). NP_054647, proteína estructural [<i>Chlamydia fago Chp2</i>]. (50 % de identidad)	5`CS + proteína de la estructura, proteína de la cápside
1 (375 pb)	ZP_02490884, proteína hipotética BpseN_15607 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13177]. (23 % de identidad)	Proteína hipotética
1 (425 pb)	FN396377, Bacteria no cultivada, integrón parcial clase 1 que contiene el gen dhfrA12, aislamiento OD 24. (100 % de identidad)	5`CS
1 (478 pb)	XP_001030466, proteína hipotética THERM_01081630 [<i>Tetrahymena thermophila</i>]. (31 % de identidad). YP_890530, citocromo P450 107B1 [<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155]. (56 % de identidad)	Proteína hipotética + citocromo
1 (555 pb)	EFM50754, proteína de transporte de potasio Kup [<i>Escherichia coli</i> NC101]. (100 % de identidad)	Proteína de transporte de potasio
1 (574 pb)	EFM50754, proteína de transporte de potasio Kup [<i>Escherichia coli</i> NC101]. (94 % de identidad). YP_444253, proteína hipotética SRU_0100 [<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855]. (37 % de identidad)	Proteína de transporte de potasio + proteína hipotética
1 (822 pb)	ZP_02187438, proteína hipotética BAL199_03109 [<i>alpha proteobacteria</i> BAL199]. (54 % de identidad)	Proteína hipotética

Número de secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
1 (859 pb)	YP_001197269, receptor dependiente de TonB [<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101]. (44 % de identidad)	Receptor dependiente de TonB
1 (887 pb)	YP_890530, citocromo P450 107B1 [<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155]. (56 % de identidad) YP_860492, oxidoreductasa dependiente de molibdeno, subunidad de unión a FAD [<i>Gramella forsetii</i> KT0803]. (67 % de identidad)	Citocromo + oxidoreductasa dependiente de molibdeno
1 (1039 pb)	YP_002508777, 3-oxoacil - sintasa III [<i>Halothermothrix orenii</i> H 168]. (50 % de identidad)	3-oxoacil - sintasa III
1 (1073 pb)	FN396377, Bacteria no cultivada, parcial integrón clase 1 que contiene el gen dhfrA12, aislamiento OD 24. (97 % de identidad) CP002039, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1, genoma completo, proteína de transporte de secreción tipo ABC bacteriocina/antibiótico. (85 % de identidad)	5'CS + proteína de transporte de secreción tipo ABC bacteriocina /antibiótico
1 (1160 pb)	FM957886, <i>Aeromonas punctata</i> parcial integrón clase 1 que contiene el gen dfr12, ORFF DNA y el gen aadA2, aislamiento 08019. (98 % de identidad)	5'CS
2 (136 pb)	NP_054647, proteína de la estructura [<i>Chlamydia fago</i> Chp2]. (51 % de identidad)	Proteína de la estructura, proteína de la cápside
2 (291 pb)	YP_003199892, transportador de resistencia de drogas, subfamilia EmrB/QacA [<i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233]. (35 % de identidad)	Transportador de resistencia de drogas
2 (319 y 416 pb)	FN396377, Bacteria no cultivada, integrón parcial clase 1 que contiene el gen dhfrA12, aislamiento OD 24. (100 % identidad). CP001068, <i>Ralstonia pickettii</i> 12J cromosoma 1, secuencia completa. (98 % de identidad)	5'CS + proteína con función desconocida DUF47
2 (430 pb)	YP_003121851, molibdopterina dehydrogenasa [<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588]. (79 % de identidad)	Molibdopterina dehydrogenasa
3 (181 pb)	YP_159185, proteína ribosomal 50S L23 [<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1]. (67 % de identidad)	Proteína ribosomal 50S
4 (253 pb)	CAS02617, posible cassette asociado a integrón [bacteria no cultivada]. (63 % de identidad)	Posible cassette asociado a integrón

Número de secuencias	Número de acceso, Definición	Descripción de la secuencia
7 (386 pb)	ZP_01048898, proteína hipotética MED134_05244 [<i>Dokdonia donghaensis</i> MED134]. (31 % de identidad)	Proteína hipotética
9 (1010 pb)	GU987053, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> cepa ST256, integrón clase 1 aminoglucósido-3"-adeniltransferasa (<i>aadA1</i>). (99 % de identidad)	5'CS, <i>attI</i> + cassette <i>aadA1</i> (resistencia a estreptomicina y espectinomicina) + 3'CS
6 (253 – 1085 pb)	No homología	No homología

En la Tabla 15 se pueden observar los números de acceso y la definición de cada secuencia, obtenidas comparando las secuencias en las bases de datos. Se testaron un total de 98 clones de posibles cassettes génicos de los cuales se secuenciaron 54 clones. Sólo en 6 de las 54 secuencias no se pudo determinar la similitud con secuencias recogidas en las bases de datos consultadas. En 48 secuencias pudimos establecer una semejanza con secuencias ya descritas. De ellas, sólo en 19 secuencias (destacadas en color rojo, Tabla 15) logramos identificar las regiones conservadas de los integrones.

Encontramos 9 secuencias en las que se identifican las regiones conservadas 5' y 3' del integrón asociadas al cassette de resistencia a estreptomicina y espectinomicina (*aadA1*). Este tipo de cassette lo hallamos a su vez, en las muestras contaminadas y no contaminadas analizadas con anterioridad, y constituye el cassette más frecuentemente encontrado en los integrones clase 1 (Levesque *et al.* 1995). En el caso de la muestra Urania, fue el único en el que se presentan de un modo claramente definido las zonas conservadas 5' y 3' presentes en los cassettes de los integrones de tipo 1 con un 99 % de identidad.

Hallamos 4 secuencias idénticas de 253 pb detalladas en la Tabla 15, en las que no se identifican ni la región conservada 5' ni la 3' pero sin embargo, la comparación con las bases de datos accesibles, nos revela que es un posible cassette asociado a un integrón perteneciente a una bacteria no cultivada. En los ambientes contaminados y no contaminados obteníamos secuencias en las que no se reconocían, igualmente, los extremos 5' y 3' de los integrones y planteábamos la posibilidad de que podrían constituir potencialmente cassettes con sitios de recombinación diferentes, todavía sin anotar en las bases de

datos. La anotación que encontramos para estas secuencias en la muestra de Urania, nos confirma de cierta forma, la existencia en el medioambiente, de cassettes diferentes a los descritos hasta el momento.

En dos secuencias, destacadas en rojo, de 425 pb y 1160 pb, se reconocen solamente la zona conservada 5'. En ambas secuencias no se pudo detectar, del mismo modo que en el caso mencionado anteriormente, el posible cassette asociado al integrón.

En otras dos secuencias se puede reconocer el extremo 5'. El resto de la secuencia posee similitud con una proteína de *Ralstonia pickettii* con función desconocida. Otra vez tenemos poca información acerca de los elementos asociados a la región conservada, típica de los integrones clase 1.

Finalmente, en dos secuencias se detectó la zona conservada 5' relacionada con una proteína de transporte tipo ABC con un 85 % de identidad y por otro lado, asociada con una proteína estructural de origen fágico.

La falta de homólogos previamente caracterizados en 6 de los clones secuenciados así como la no exactitud en la denominación del tipo de cassette en el integrón en algunas de las secuencias obtenidas, nos lleva a pensar en que hay mucho por descubrir todavía en este ambiente. Estas secuencias no codificantes son proteínas nuevas de las que actualmente desconocemos su función.

El resto de las secuencias encontradas no están flanqueadas por las regiones conservadas típicas de los integrones aunque sí presentan repeticiones habituales en las secuencias *att*. Entre ellas podemos destacar aquellas proteínas relacionadas con la resistencia-sensibilidad a los antibióticos como proteínas transportadoras y perteneciente a la familia de porinas. También encontramos proteínas hipotéticas, reductasas, sintasas y deshidrogenasas. Estas proteínas pueden estar involucradas igualmente en mecanismos de resistencia - sensibilidad a los antibióticos, dado que se ha visto en artículos recientes, que mutaciones en genes relacionados con el metabolismo celular, provocan cambios en la susceptibilidad a los antibióticos (Fajardo *et al.* 2008).

En la Fig. 11 se representan las regiones centrales amplificadas en la muestra de Urania. El mayor porcentaje lo constituye el cassette de resistencia a estreptomicina y espectinomicina (*aadA1*) hallado con un 17 %. Luego encontramos aquellas secuencias para las que no obtuvimos similitud con proteínas descritas en las bases de datos (13 %) y a continuación con un 11 %

las proteínas hipotéticas. Con un porcentaje del 7 % hallamos las secuencias que coinciden con un posible cassette asociado a los integrones y que desconocemos cuál pueda ser. El resto de las secuencias están representadas ocupando de manera general la misma proporción en la muestra. El hecho de que la mayoría de las secuencias encontradas, con excepción del cassette *aadA1*, sean proteínas hipotéticas y secuencias sin definición nos hace pensar en la riqueza génica de la muestra *Urania* así como en un alto grado de inespecificidad en las regiones flanqueantes de los cassettes génicos presentes en *Urania*.

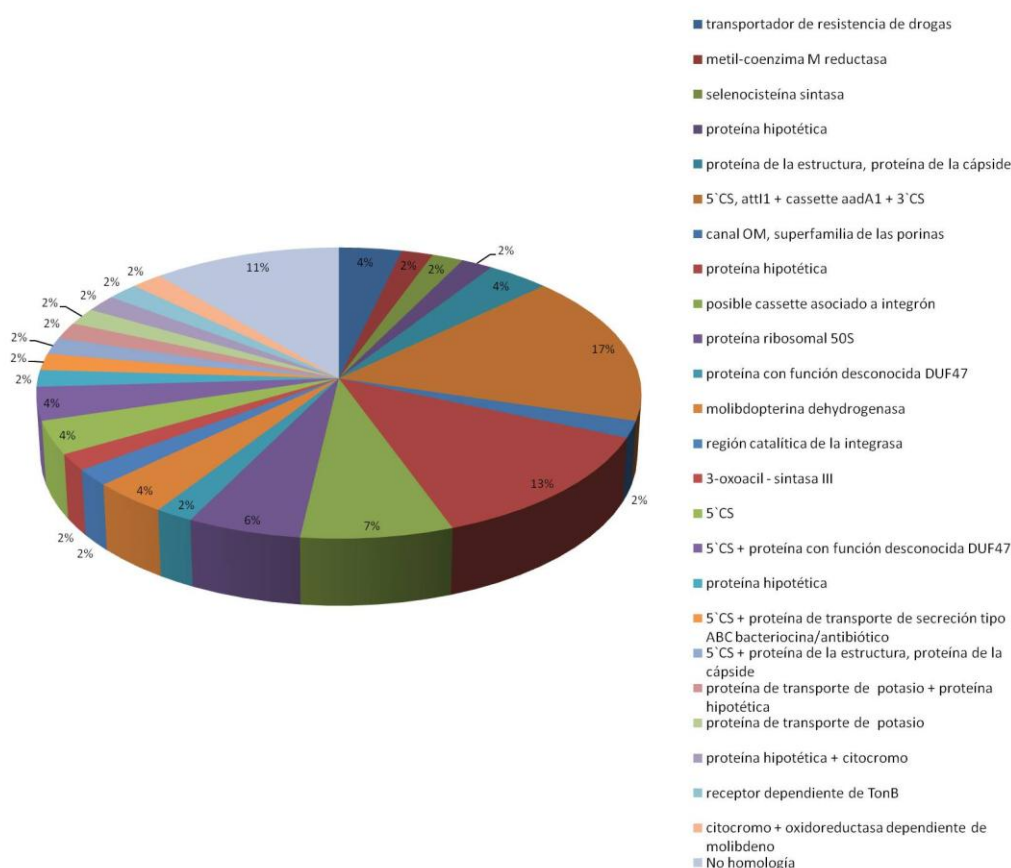


Fig. 11. Tipos de regiones centrales amplificadas en la muestra *Urania*.

El cassette de resistencia a estreptomicina y espectinomina (*aadA1*) es el más representado en la muestra con un 17 %. Seguidamente, encontramos con un 13 % las secuencias sin similitud descrita en las bases de datos examinadas y las proteínas hipotéticas con un 11 %.

4.3. Análisis de las muestras procedentes del intestino humano

Se analizaron 10 muestras de pacientes enfermos con colitis ulcerosa, 4 muestras sucesivas en el transcurso de un año de un paciente con colitis ulcerosa y 26 muestras procedentes de voluntarios sanos. Se obtuvo solamente una integrasa, del tipo 1, igual para todos los casos amplificados, perteneciente tanto a muestras de pacientes enfermos como voluntarios sanos analizados.

Viendo este resultado, decidimos buscar además, los genes *qac* y *sul* característicos de la estructura de los integrones tipo 1 e investigar la presencia de integrasas tipo 2.

Al igual que para la integrasa tipo 1, se obtuvo solamente una única integrasa tipo 2 en las muestras amplificadas. Para el caso del gen *sul*, obtuvimos amplificación pero al secuenciar no correspondía con el gen de resistencia a sulfonamidas. Sin embargo, con los cebadores *qac* conseguimos amplificar y secuenciar un único *qacE11* propio de los integrones tipo 1 e idéntico en todos los casos amplificados tanto en pacientes enfermos como voluntarios sanos, confirmando así la presencia de un integrón tipo 1 en las muestras intestinales humanas analizadas.

En la Tabla 16 se muestra de forma detallada el número de muestras tanto de pacientes enfermos como voluntarios sanos en las que se amplificó cada uno de los genes.

Tabla 16. Genes amplificados en las muestras intestinales humanas.

Muestras	<i>intl1</i>	<i>sul1</i>	<i>qac</i>	<i>intl2</i>
Pacientes con colitis ulcerosa (10)	2	-	5	ND
Muestras sucesivas en el transcurso de un año de un paciente con colitis ulcerosa (4)	2	-	2	ND
Voluntarios sanos (26)	11	-	6	4

ND: no determinado

Observando la Tabla 16, podemos decir que de los 10 pacientes con colitis ulcerosa, 5 de ellos presentan el gen *qac*, sin embargo, sólo en 2 de ellos se pudo obtener la correspondiente integrasa tipo 1. Se obtuvieron los genes *intl1* y *qac* en las últimas dos muestras sucesivas en el transcurso de un año pertenecientes al paciente con colitis ulcerosa. En el caso de los voluntarios sanos, únicamente dos muestras presentan tanto la integrasa tipo 1 como el gen *qac*. Tres de los voluntarios sanos donde se obtuvo la integrasa tipo 2 también presentan el gen para la integrasa tipo 1, *intl1*.

Los resultados de las muestras del intestino humano estudiadas, nos indican que en el ambiente clínico observamos una baja variabilidad de integrasas. El paso de *intl1* de los ecosistemas naturales al ambiente clínico podría justificarse por haber sido la primera en asociarse con determinantes de resistencia y que bajo presión selectiva se favoreciera tanto su diseminación como su permanencia en el ambiente clínico. El hecho de que en la estructura de los integrones tipo 1 encontremos el gen de resistencia *qac*, que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio, como los desinfectantes comúnmente usados en los hospitales, justifica también la presencia de integrones tipo 1 en las bacterias patógenas y por tanto en aquellos ambientes que han sido contaminados por la mano del hombre.

4.4. Análisis global de los resultados obtenidos para las integrasas y las regiones centrales de los integrones tipo 1 en los distintos ambientes estudiados

En la Fig. 12 se observa el árbol de identidades confeccionado a partir del alineamiento de las integrasas obtenidas en los ambientes contaminados, no contaminados, alejados de la actividad humana (Urania) y procedentes del intestino humano investigadas en este estudio.

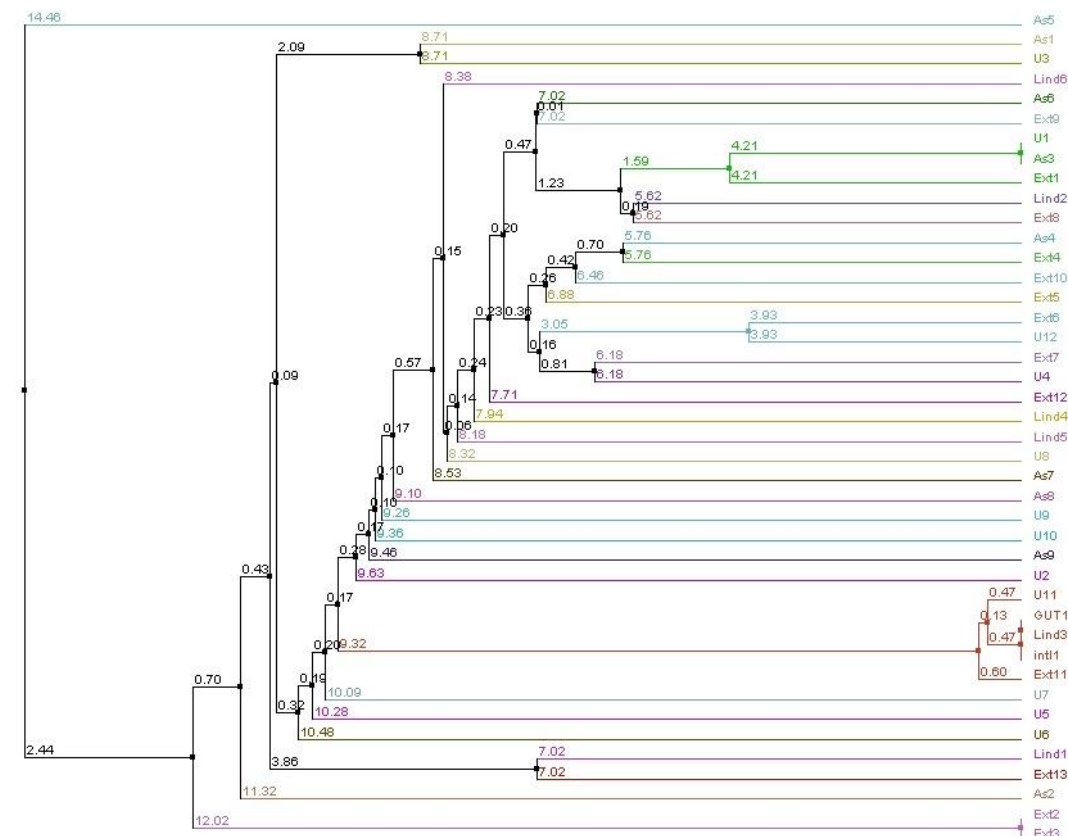


Fig. 12. Árbol de identidades de las integrasas obtenidas en todos los ambientes analizados.

La integrasa *intl1* obtenida en las muestras intestinales la denominamos GUT1 para diferenciarla en el árbol de la integrasa *intl1* de referencia. No observamos un agrupamiento de las integrasas de acuerdo con el tipo de ambiente analizado.

Examinando el árbol de identidades obtenido, podemos decir que no observamos un agrupamiento entre las diferentes integrasas encontradas en función del tipo de ambiente analizado. Nuestros resultados indican que no existe una especificidad de integrón integrasas asociadas a un hábitat determinado y por tanto, de elementos de captura génica en los diferentes ambientes estudiados. Sin embargo, la distribución de estos elementos es mucho más amplia y variada en los ambientes naturales analizados (contaminados, no contaminados y alejados de la actividad humana) en comparación con el ambiente clínico (muestras intestinales humanas).

Las únicas integrasas *intl1*, obtenidas en todos los ambientes estudiados son U11, GUT1, Lind3 y Ext11. El resto de las integrasas son secuencias nuevas que presentan similitud con integrasas previamente descritas, pertenecientes en su mayoría a bacterias no cultivadas y con porcentajes de identidad mayores del 50 % con integrasas descritas.

En la Fig. 13, podemos ver las regiones centrales amplificadas en los distintos ambientes naturales analizados.

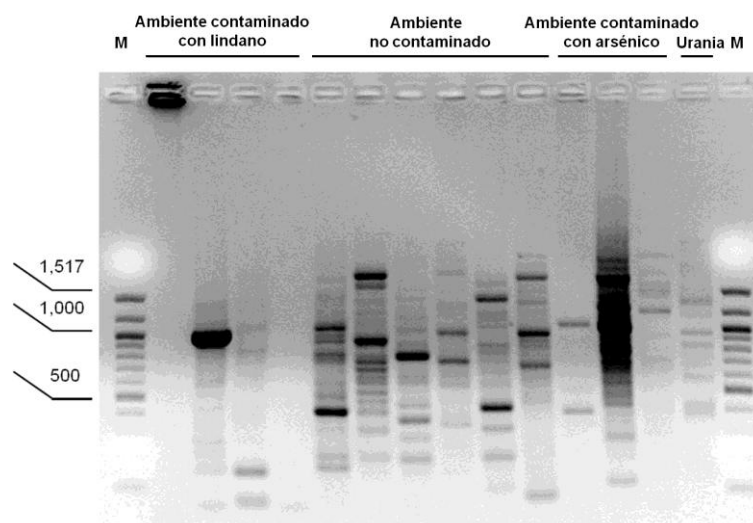


Fig. 13. Amplificación de las regiones centrales en los ambientes contaminados con lindano y arsénico, no contaminados y la fosa Urania.

En los ambientes contaminados, no contaminados y la fosa Urania, encontramos una gran variedad de posibles cassettes que pudieran estar asociados con diferentes elementos genéticos.

M: marcador de peso molecular.

En general, observamos una amplia variabilidad de regiones centrales (posibles cassettes) tanto en las muestras no contaminadas (Extremadura) como en las muestras contaminadas (Lindano y Arsénico) y la fosa marina Urania.

4.5. Cuantificación de integrasas tipo 1 en ambientes contaminados y no contaminados mediante PCR en tiempo real

Hasta ahora, todas las estimaciones acerca de la abundancia de integrones en ambientes naturales están basadas en bacterias que se pueden cultivar en condiciones de laboratorio (Hardwick *et al.* 2008). Mediante PCR en tiempo real, analizamos la presencia de estos elementos en bacterias que no han sido cultivadas, conociendo así la distribución de los integrones fuera del contexto clínico.

En la Fig. 14 pueden observarse las curvas de calibración obtenidas para los genes 16S e *intl1* analizados. Las curvas presentaron buenos valores de pendiente y procesividad.

En la Tabla 17 se presentan los valores absolutos obtenidos para las muestras contaminadas y no contaminadas, de los genes amplificados 16S e *intl1*.

Los resultados obtenidos en los ambientes contaminados y no contaminados, sugieren que existe un aumento en el número de *intl1* en ambientes contaminados en comparación con los ambientes no contaminados. De manera general, hallamos que el porcentaje de *intl1* en ambos ambientes es muy bajo. Si tenemos en cuenta que el 16S se encontró en el orden de 1×10^9 y 1×10^{10} copias del gen por nanogramo de DNA en ambos ambientes, mientras que el gen *intl1*, se localizó en ambientes contaminados en el orden de 1×10^6 copias y en ambientes no contaminados en el orden de 1×10^4 y 1×10^5 copias del gen *intl1*, podemos decir que 1 entre 1000 y 10 000 Eubacterias presentes en las muestras contaminadas, contienen el gen *intl1*, mientras que en las muestras no contaminadas, hallamos el gen *intl1* en 1 entre 100 000 y 1000 000 Eubacterias.

Curva estándar 16S

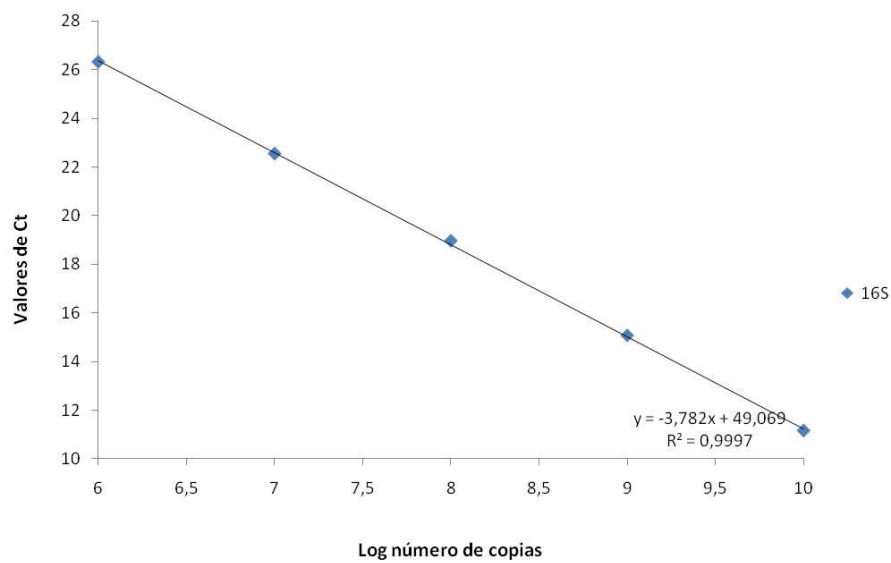
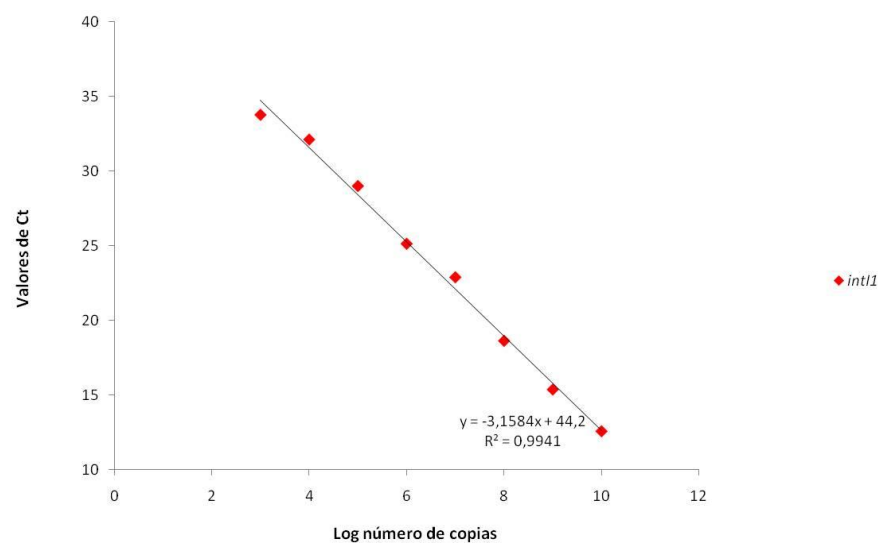
Curva estándar *int11*

Fig. 14. Curvas de calibración obtenidas para los genes 16S e *int11*.

Las curvas estándares obtenidas para cada uno de los genes muestran buenos valores de pendiente. Pudimos detectar, para el caso del gen *int11*, hasta 100 copias del gen.

Tabla 17. Número de copias de los genes 16S e *intl1* obtenidos para las muestras contaminadas y no contaminadas.

	Muestras	Nº de copias del gen 16S	Nº de copias del gen <i>intl1</i>	Porcentaje de <i>intl1</i>
Contaminados	Muestra 1	1.15e+07	<e+02	-
	Muestra 2	7.45e+09	2.52e+06	3,38e-02
	Muestra 3	8.94e+07	7.89e+03	8,83e-03
	Muestra 4	5.57e+07	6.46e+03	1,16e-02
	Muestra T	9.70e+09	7.65e+06	7,89e-02
	Muestra L	3.42e+09	5.48e+06	1,60e-01
	Muestra EC	6.73e+09	4.05e+06	6,02e-02
No contaminados	Muestra 5	1.04e+010	8.73e+05	8,39e-03
	Muestra 6	1.63e+010	1.48e+05	9,08e-04
	Muestra 7	1.55e+010	7.07e+06	4,56e-02
	Muestra 8	1.08e+009	6.22e+04	5,76e-03
	Muestra 9	5.34e+009	1.37e+04	2,57e-04
	Muestra 10	6.05e+009	8.49e+04	1,40e-03

Las muestras 3 y 4 pertenecientes a los ambientes contaminados, presentaron menor número de copias del gen *intl1*. En estas muestras no pudimos amplificar integrasas cuando analizamos la presencia de éstas en el apartado 4.2, sin embargo, sí obtuvimos regiones centrales. En estas dos muestras, no fuimos capaces de detectar las integrasas asociadas a los cassettes bien porque se encontraban en baja concentración o solapadas con otras bandas, lo que se correspondería el haber hallado un menor número de *intl1* mediante PCR en tiempo real. En la muestra 1, procedente también de ambientes contaminados, no pudimos amplificar ni integrasas ni regiones centrales en el apartado 4.2, ni detectar *intl1* por PCR en tiempo real. De haber integrasas en esta muestra estaría por debajo de las 100 copias del gen *intl1*, ya que éste fue el número mínimo que pudimos detectar cuando realizamos la curva estándar del gen.

Es necesario subrayar que en la determinación del gen 16S e *intl1*, no tenemos en cuenta la posibilidad de que algunas bacterias puedan tener más de una copia de estos genes, lo que podría indicar que el número de integrasas por bacteria es superior al que hemos estimado.

Los valores obtenidos por PCR en tiempo real, sugieren que los ecosistemas contaminados presentan un mayor número de integrasas por célula. Sin embargo, la variabilidad entre las muestras impiden que se pueda establecer una relación inequívoca entre la presencia de integrones y la contaminación ambiental. La proporción de la población que posea integrones pudiera variar como consecuencia de la capacidad de dispersión de los integrones, de la presencia de microorganismos que se encuentren transitoriamente en estos ecosistemas, de la intensidad en la presión selectiva o de la transferencia horizontal de genes, entre otros factores.

4.6. Análisis bioinformático

El aumento de secuencias en las bases de datos de genomas bacterianos y la aparición de bases de datos completamente nuevas de metagenomas obtenidos en diversos ambientes nos permite acceder a una gran cantidad de información, difícil de imaginar unos años atrás.

En base a esta situación, nos hemos propuesto buscar integrasas en los diferentes genomas y metagenomas de los que hasta ahora disponemos así como los diferentes genes que forman parte de la estructura de los integrones.

4.6.1. Búsqueda de integrones en bases de datos de genomas completos y parciales (WGS) de bacterias ya secuenciadas

El gen *intl1* se buscó en las bases de datos de genomas completos y parciales (WGS) ya secuenciados disponibles en la red. Se analizaron un total de 1014 genomas. De los 1014 genomas estudiados, mostramos en la Tabla 18 los 59 microorganismos diferentes con integrón integrasas encontrados, con porcentajes de identidad entre 50 % y 100 % respecto a *intl1*.

Tabla 18. Microorganismos con *intl1*.

Microorganismos con integrasas tipo 1 (<i>intl1</i>)	
<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Methylobacillus flagellatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>
<i>Alcanivorax</i> sp.	<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i>	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
<i>Alteromonadales bacterium</i>	<i>Pelobacter carbinolicus</i>
<i>Aromatoleum aromaticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Arthrospira maxima</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Blastopirellula marina</i>	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	<i>Salinibacter ruber</i>
<i>Chloroflexus aggregans</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Chloroherpeton thalassium</i>	<i>Shewanella baltica</i>
<i>Chthoniobacter flavus</i>	<i>Shewanella halifaxensis</i>
<i>Congregibacter litoralis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Cyanobium</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.
<i>Dechloromonas aromatica</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Diaphorobacter</i> sp.	<i>Sorangium cellulosum</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>
<i>Gemmata obscuriglobus</i>	<i>Synechococcus</i> sp.
<i>Geobacter lovleyi</i>	<i>Thioalkalivibrio</i> sp.
<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Lutiella nitroferum</i>	<i>Verrucomicrobiae bacterium</i>
<i>Marinobacter algicola</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>
<i>Marinobacter aquaeolei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>
	<i>Yersinia pestis</i>

Como se puede observar en la Tabla 18 encontramos múltiples microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos que presentan integrón integrasas. Estos microorganismos, en su mayoría patógenos, pueden vivir en diferentes hábitats por lo que hallamos una gran variedad de microorganismos capaces de colonizar un amplio rango de medioambientes y en los que están distribuidos las integrón integrasas.

Una vez que teníamos el resultado en la búsqueda de *int1*, buscamos el resto de los genes que forman parte de la estructura de los integrones: *qacE1*, *sul1* y *orf5*. En la Tabla 19 indicamos los porcentajes de identidad de cada uno de los genes en los microorganismos encontrados, hasta un 48 %.

Tabla 19. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en genomas completos y parciales.

Microorganismos	<i>int1</i>	<i>qacE1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
1) <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. SL480 gcontig_1106389297908, WGS.	99 %	100 %	100 %	100 %
2) <i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
3) <i>Acinetobacter baumannii</i> AYE, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
4) <i>Escherichia coli</i> APEC O1 plásmido pAPEC-O1-R, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
5) <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH 78578 plásmido pKPN5, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	-
6) <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Newport str. SL254 plásmido pSN254, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
7) <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67 plásmido pSC138, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	-
8) <i>Escherichia coli</i> 101-1 gcontig_1112603665837, WGS.	99 %	100 %	100 %	100 %
9) <i>Escherichia coli</i> B171 gcontig_1112554186089, WGS.	99 %	100 %	100 %	100 %
10) <i>Yersinia pestis</i> biovar Orientalis str. IP275 gcontig_1106166534804, WGS.	99 %	100 %	100 %	100 %
11) <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633 plásmido pCVM19633_110, genoma completo.	99 %	75 %	43 %	-
12) <i>Escherichia coli</i> SMS-3-5 plásmido pSMS35_130, genoma completo.	99 %	-	52 %	-

Microorganismos	<i>int1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
13) <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449 plásmido pAsa4, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
14) <i>Yersinia pestis</i> biovar Orientalis str. IP275 plásmido pIP1202, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	100 %
15) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18 plásmido pHCM1, genoma completo.	99 %	-	53 %	-
16) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Virchow str. SL491 gcontig_1112707573884, WGS.	99 %	100 %	100 %	92 %
17) <i>Vibrio cholerae</i> B33 gcontig_1104196056139, WGS.	99 %	100 %	100 %	-
18) <i>Escherichia coli</i> UMN026, genoma completo.	99 %	100 %	100 %	90 %
19) <i>Escherichia coli</i> B7A gcontig_1112495746548, WGS.	99 %	100 %	100 %	100 %
20) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, genoma completo.	97 %	-	100 %	-
21) <i>Acinetobacter baumannii</i> AB0057, genoma completo.	95 %	100 %	100 %	100 %
22) <i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129, genoma completo.	86 %	-	99 %	100 %
23) <i>Diaphorobacter</i> sp. TPSY, genoma completo.	60 %	-	-	-
24) <i>Acidovorax</i> sp. JS42, genoma completo.	60 %	-	-	-
25) <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718, genoma completo.	58 %	-	-	-
26) <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1, genoma completo.	57 %	-	-	-
27) <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259, genoma completo.	57 %	-	-	-
28) <i>Nitrosomonas eutropha</i> C91, genoma completo.	57 %	-	-	-
29) <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15, genoma completo.	56 %	-	36 %	-
30) <i>Methylobacillus flagellatus</i> KT, genoma completo.	55 %	61 %	34 %	-

Microorganismos	<i>intl1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
31) <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB, genoma completo.	55 %	-	36 %	-
32) <i>Nitrococcus mobilis</i> Nb-231 1099646003858, WGS.	55 %	-	35 %	-
33) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. 8004, genoma completo.	55 %	55 %	-	-
34) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913, genoma completo.	55 %	55 %	-	-
35) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, genoma completo.	55 %	-	-	-
36) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, genoma completo.	55 %	-	-	-
37) <i>Geobacter lovleyi</i> SZ, genoma completo.	54 %	-	-	-
38) <i>Thioalkalivibrio</i> sp. HL-EbGR7, genoma completo.	54 %	-	-	-
39) <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, genoma completo.	54 %	-	-	-
40) <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335 ctg_1103496006884, WGS.	53 %	-	-	-
41) <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1, genoma completo.	53 %	-	-	-
42) <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8, genoma completo.	52 %	68 %	-	-
43) <i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428 ctg73, WGS.	52 %	-	-	-
44) <i>Congregibacter litoralis</i> KT71 strain KT 71 1097664134131, WGS.	51 %	-	-	-
45) <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> DSM 684 ctg23, WGS.	50 %	-	-	-
46) <i>Marinobacter algicola</i> DG893 1103407001928, WGS.	50 %	-	-	-
47-100)	50-48 %	-	-	-

En la Fig. 15 detallamos la estructura de los integrones así como el entorno genético en el que se encuentran.

Con los colores rojo, naranja, azul y morado se resaltan los genes presentes en la estructura básica de los integrones de tipo 1. Otros genes de importancia también están coloreados como los que codifican transposasas y secuencias de inserción repetidas, necesarias para que los integrones puedan diseminarse mediante transferencia horizontal de genes.

Los genes de resistencia a aminoglucósidos *aadA1* que confieren resistencia a estreptomicina y espectinomicina, se encuentran destacados en color amarillo. Como podemos ver, este gen de resistencia se encuentra en muchos casos, asociado a los integrones tipo 1.

También se observan proteínas hipotéticas (color verde), muchas de ellas formando parte de la estructura del integrón, y que nos hace pensar nuevamente, en la posible ventaja o función que podría reportar a la bacteria para ser seleccionada en el ambiente y reclutada dentro de la estructura de un integrón.

En la Fig. 15 se representa el entorno genético de *intl* hasta el microorganismo número 22: *Corynebacterium diphtheriae*. Los microorganismos numerados del 25 al 100 (Tabla 19), no presentan integrones tipo 1. Las integrasas obtenidas para éstos microorganismos por comparación con el gen *intl1*, constituyen integrón integrasas, no *intl1*. La presencia del resto de los genes típicos de la estructura de los integrones tipo 1 en éstos microorganismos es prácticamente nula y en los casos en que aparecen, la similitud es baja. El entorno genético de las integrón integrasas no presenta la estructura propia de los integrones tipo 1. Los genes *qac* y *sul1*, en aquellos microorganismos donde se localizaron, se encontraban a gran distancia unos de otros en el genoma y de la integrasa. El nombre de los genes representados en la Fig. 15 se indica en el Anexo I.

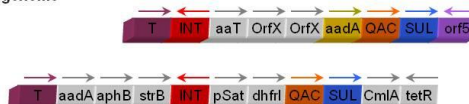
- 1) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund str. SL480 gcontig_1106389297908, whole genome shotgun sequence



- 2) *Acinetobacter baumannii* ACICU, complete genome



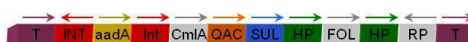
- 3) *Acinetobacter baumannii* AYE, complete genome



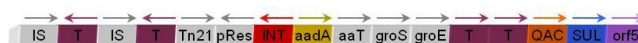
- 4) *Escherichia coli* APEC O1 plasmid pAPEC-O1-R, complete sequence



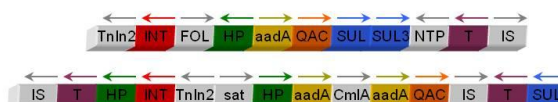
- 5) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 plasmid pKPN5, complete sequence



- 6) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. SL254 plasmid pSN254, complete sequence



- 7) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67 plasmid pSC138, complete sequence



- 8) *Escherichia coli* 101-1 gcontig_1112603665837, whole genome shotgun sequence



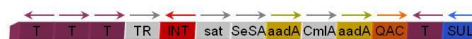
- 9) *Escherichia coli* B171 gcontig_1112554186089, whole genome shotgun sequence



- 10) *Yersinia pestis* biovar *Orientalis* str. IP275 gcontig_1106166534804, whole genome shotgun sequence



- 11) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund str. CVM19633 plasmid pCVM19633_110, complete sequence



- 12) *Escherichia coli* SMS-3-5 plasmid pSMS35_130, complete sequence



- 13) *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 plasmid pAa4, complete sequence



- 14) *Yersinia pestis* biovar *Orientalis* str. IP275 plasmid pIP1202, complete sequence



- 15) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18 plasmid pHCM1, complete sequence



- 16) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Virchow str. SL491 gcontig_1112707573884, whole genome shotgun sequence



Resultados

17) *Vibrio cholerae* B33 gcontig_1104196056139, whole genome shotgun sequence



18) *Escherichia coli* UMN026, complete genome



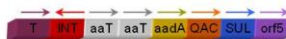
19) *Escherichia coli* B7A gcontig_1112495746548, whole genome shotgun sequence



20) *Pseudomonas aeruginosa* PA7, complete genome



21) *Acinetobacter baumannii* AB0057, complete genome



22) *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, complete genome



Fig. 15. Estructura de los posibles integrones y entorno genético.

Los genes que no se dibujaron se encontraban muy distanciados en el genoma. Con color rojo se destaca el gen *int1*, los colores naranja, azul y morado se corresponden con el resto de los genes que conforman la estructura de los integrones: *qac*, *sul* y *orf5* respectivamente. Con color rojo vino se resaltan además las transposasas y secuencias de inserción, con verde oscuro las proteínas hipotéticas y con amarillo el gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina: *aadA*.

Como se puede observar en la Fig. 15, la mayoría de los integrones están asociados a transposones, transposasas o secuencias de inserción, elementos relacionados con la movilidad génica, que garantizarían su transferencia y diseminación entre distintos microorganismos, en diferentes ambientes.

4.6.2. Búsqueda de genes presentes en los integrones en bases de metagenomas

4.6.2.1. Búsqueda en la base de metagenomas MG-RAST

Se buscaron los genes presentes en los integrones tipo 1 en la base de metagenomas MG-RAST. Esta base de datos de metagenomas es una base de anotación libre en la que se agrupan metagenomas de diversa procedencia (Glass *et al.*). Se analizaron todos los metagenomas que estaban anotados, un total de 391.

La base de metagenomas MG-RAST es una base relativamente nueva que no permite la búsqueda de un gen en todos sus metagenomas anotados simultáneamente, por lo que la búsqueda del gen *intI1* se realizó individualmente en los 391 metagenomas analizados. Aquellos metagenomas donde encontramos una similitud mayor del 50 % con *intI1* fueron seleccionados para buscar en ellos el resto de los genes propios de la estructura de los integrones tipo 1.

En la Tabla 20 se observa de forma resumida aquellos metagenomas donde obtuvimos porcentajes de identidad superiores al 50 % respecto al gen *intI1* y los porcentajes de identidad para los genes *sul1*, *qacEΔ1* y *orf5* obtenidos en cada uno de ellos. De 391 metagenomas analizados, en 22 metagenomas encontramos integrasas. Sólo encontramos integrasa tipo 1 en los metagenomas resaltados en la tabla en color rojo.

Tabla 20. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas MG-RAST.

Metagenoma	<i>intI1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
" <i>Alvinella Pompejana Epibiont</i> (4441663.3) y (4441102.3)"	67 %	49 %	51 %	-
" <i>AntarcticaAquatic_4 - MARINE DERIVED LAKE</i> (4443681.3)"	65 %	61 %	50 %	-
" <i>Australian Phosphorus Removing (EBPR) Sludge</i> (4441092.3)"	100 %	100 %	100 %	100 %
" <i>BBAY15</i> (4443693.3) from Project Botany Bay Metagenomic"	63 %	66 %	52 %	-
" <i>GS000a Shotgun - Open Ocean - Sargasso Sea - Sargasso Station 11-Bermuda</i> (4441570.3) y (4441571.3)"	99 %	98 %	51 %	-
" <i>GS000b Shotgun - Open Ocean - Sargasso Sea - Sargasso Station 13 - Bermuda</i> (4441573.3) y <i>GS000b_11</i> (4441572.3)"	66 %	80 %	50 %	-
" <i>GS007</i> (4442709.3) y <i>GS007 Shotgun - Coastal - North American East Coast - Northern Gulf of Maine - Canada</i> (4441153.3)"	67 %	75 %	50 %	-
" <i>GS008 Shotgun - Coastal - North American East Coast - Newport Harbor, RI - USA</i> (4441583.3)"	51 %	79 %	99 %	100 %
" <i>GS011 Shotgun - Estuary - North</i> "	97 %	78 %	64 %	-

<i>American East Coast - Delaware Bay, NJ - USA (4441658.3)</i>				
<i>"GS012 Shotgun - Estuary - North American East Coast - Chesapeake Bay, MD - USA (4441584.3)"</i>	67 %	67 %	54 %	-
<i>"GS013 Shotgun - Coastal - North American East Coast - Off Nags Head, NC - USA (4441585.3)"</i>	59 %	76 %	53 %	-
<i>"GS032 Shotgun - Mangrove - Galapagos Islands - Mangrove on Isabella Island - Ecuador (4441598.3)"</i>	64 %	72 %	52 %	-
<i>"GS033 Shotgun - Hypersaline - Galapagos Islands - Punta Cormorant, Hypersaline Lagoon, Floreana Island - Ecuador (4441599.3)"</i>	66 %	81 %	55 %	-
<i>"Guerrero Negro 2-3mm (4440965.3)"</i>	62 %	-	50 %	-
<i>"Guerrero Negro 22-34mm (4440971.3)"</i>	64 %	65 %	52 %	-
<i>"Guerrero Negro 3-4mm (4440966.3)"</i>	64 %	55 %	46 %	-
<i>"Guerrero Negro 5-6mm (4440969.3)"</i>	62 %	48 %	47 %	-
<i>"UBA Acid Mine Drainage Biofilm (4441138.3)"</i>	50 %	43 %	52 %	-
<i>"US Phosphorus Removing (EBPR) Sludge (4441093.3)"</i>	72 %	74 %	95 %	-
<i>"Waseca Farm Soil (4441091.3)"</i>	62 %	59 %	51 %	-
<i>"Whale fall Mat (4441656.4)"</i>	61 %	76 %	52 %	-
<i>"Whale fall Rib (4441620.3)"</i>	56 %	69 %	47 %	-

Encontramos integrasas tipo 1 (color rojo) en los metagenomas *"Australian Phosphorus Removing (EBPR) Sludge (4441092.3)"*, *"GS000a Shotgun - Open Ocean - Sargasso Sea (4441570.3), (4441571.3)"* y *"GS011 Shotgun - Estuary - North American East Coast - Delaware Bay, (4441658.3)"*.

Usualmente el tamaño de los *contigs* en las bases de datos no permite ver varios genes a la vez. Sin embargo, en nuestro caso, logramos detectar en el metagenoma de *"Australian Phosphorus Removing (EBPR) Sludge (4441092.3)"*, en el *contig* 80123195, los genes *qac* y *sul1*, mientras que en el *contig* 80196970, encontramos los genes *sul1* y *orf5*. Esto nos confirma la presencia de un integrón tipo 1 con todos los genes propios de su estructura, en este ecosistema. Analizando los datos obtenidos a lo largo de la tesis, podemos decir que la presencia de integrones tipo 1 no es usual en ambientes naturales libres de contaminación antropogénica, no así las integrón integrasas.

No obstante, encontramos una integrasa tipo 1 en el metagenoma “*Australian Phosphorus Removing (EBPR) Sludge (4441092.3)*”, pero este ecosistema es un ambiente contaminado por la actividad humana y por tanto, en el que probablemente, haya bacterias patógenas y determinantes de resistencia. Las otras dos integrasas tipo 1 procedentes de los metagenomas del Mar de los Sargazos y de la Bahía Delaware, bien podrían constituir ambientes que han sido contaminados por la actividad humana y entonces estaríamos en el mismo caso que el explicado anteriormente.

En los metagenomas “*GS008 Shotgun - Coastal - North American East Coast - Newport Harbor, RI - USA (4441583.3)*” (color azul) y “*US Phosphorus Removing (EBPR) Sludge (4441093.3)*” (color verde), encontramos los genes *sul1* y *orf5* en el primer caso, y *sul1* en el segundo, lo que nos revela la presencia de un posible integrón tipo 1 en estos dos ambientes aunque no encontramos la integrasa *intl1*.

4.6.2.2. Búsqueda en la base de metagenomas CAMERA

En la base de metagenomas CAMERA sólo se encuentran metagenomas de origen marino. Actualmente, CAMERA cuenta con 800 metagenomas disponibles contra los cuales fueron comparados cada uno de los genes que forman parte de la estructura de los integrones tipo 1, utilizando para ello los parámetros establecidos por defecto.

En la Tabla 21 pueden observarse los porcentajes de identidad de los genes *intl1*, *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*, obtenidos tras la comparación con los metagenomas marinos anotados en la base CAMERA. Se obtuvieron integrasas *intl* (color rojo) en los metagenomas “*Delaware Bay, NJ*”, “*Thornside Sewage Treatment Plant*” y “*Sargasso Station 11, 13*”.

Tabla 21. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas CAMERA.

Metagenoma	<i>intl1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
<i>"Delaware Bay, NJ"</i>	99 %	59 %	49 %	39 %
<i>"Thornside Sewage Treatment Plant"</i>	94 %	-	100 %	100 %
<i>"Sargasso Station 11; Sargasso Station 13"</i>	93 %	93 %	-	-
<i>"Punta Cormorant, Hypersaline Lagoon, Floreana Island"</i>	50 %	67 %	-	-
<i>"Nine Springs Wastewater Treatment Plant"</i>	58 %	-	92 %	-
<i>"Lake Gatun"</i>	50 %	-	-	-
<i>"Upwelling, Fernandina Island"</i>	-	61 %	48 %	-
<i>"Rangirora Atoll"</i>	-	57 %	-	-
<i>"Indian Ocean"</i>	-	57 %	-	24 %
<i>"Rosario Bank"</i>	-	55 %	-	-
<i>"Coastal Floreana"</i>	-	56 %	52 %	-
<i>"Yucatan Channel"</i>	-	55 %	-	24 %
<i>"Off Key West, FL"</i>	-	57 %	-	-
<i>"201 miles from F. Polynesia"</i>	-	55 %	-	-
<i>"Gulf of Mexico"</i>	-	54 %	-	24 %
<i>"St. Anne Island, Seychelles"</i>	-	55 %	-	-
<i>"Newport Harbor, RI"</i>	-	-	99 %	100 %
<i>"30 miles from Cocos Island"</i>	-	-	50 %	24 %
<i>"250 miles from Panama City"</i>	-	-	50 %	24 %
<i>"North Seamore Island"</i>	-	-	51 %	27 %
<i>"Devil's Crown, Floreana Island"</i>	-	-	49 %	-
<i>"Gulf of Panama"</i>	-	-	50 %	-
<i>"Wolf Island"</i>	-	-	37 %	-
<i>"Waseca County"</i>	-	-	-	39 %
<i>"Cocos Keeling, Inside Lagoon"</i>	-	-	-	26 %
<i>"Hawaii Ocean Time-series station ALOHA, 10 m"</i>	-	-	-	32 %
<i>"500 Miles west of the Seychelles in the Indian Ocean"</i>	-	-	-	24 %
<i>"Warm seep, Roca Redonda"</i>	-	-	-	27 %

Nuevamente encontramos integrasas tipo 1 en los metagenomas del Mar de los Sargazos, en la Bahía Delaware y en la planta de tratamiento contaminada con fósforo en Australia, los mismos ecosistemas en los que encontramos *intl1* cuando buscamos en la base de datos MG-RAST. Los porcentajes de identidad son diferentes y en algunos casos no aparecen todos los genes, probablemente esto se deba a la anotación incompleta de estos tres metagenomas en la base de metagenomas CAMERA.

Encontramos además, integrón integrasas en los metagenomas marinos de “*Punta Cormorant*”, “*Nine Springs Wastewater Treatment Plant*” y “*Lake Gatun*”. En el metagenoma de “*Nine Springs Wastewater Treatment Plant*”, localizamos al gen *sul1*, lo que nos pudiera indicar la presencia de un integrón tipo 1 en este ecosistema, aunque no encontramos la integrasa *intl1* sino una integrón integrasa con un porcentaje del 58 %. Este metagenoma corresponde, una vez más, a un ecosistema contaminado por la actividad humana, por lo que la presencia de integrones tipo 1 podría estar dada por esta causa.

Otro ambiente a mencionar es “*Newport Harbor, RI*” (color azul), donde los genes *sul1* y *orf5*, nos revela posiblemente la presencia de un integrón tipo 1 aunque no encontramos ni la integrasa *intl1* ni el gen *qac*. Puede ser que este metagenoma no esté completamente anotado o no se hallan podido ensamblar totalmente los *contigs* ya que en la base MG-RAST encontrábamos una integrón integrasa con un 51 % y un gen parecido a *sul1* con un 79 % que no hallamos en la búsqueda en CAMERA.

4.6.2.3. Búsqueda en la base de metagenomas IMG/M

La base de metagenomas IMG/M no permite, del mismo modo que pasa con la base MG-RAST, la comparación contra todos sus metagenomas simultáneamente, por lo que se realizó la búsqueda del gen *intl1*, uno a uno, en los 136 metagenomas que actualmente conforman dicha base. En los metagenomas en los que encontramos *intl1* con un porcentaje mayor del 50 %, se buscaron los otros genes pertenecientes a la estructura de los integrones tipo 1, los cuales se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas IMG/M.

Metagenoma	<i>intl1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>orf5</i>
<i>"Air microbial communities Singapore indoor air filters 2"</i>	99 %	73 %	49 %	47 %
<i>"Anaerobic methane oxidation (AOM) community from Eel River Basin sediment, California"</i>	75 %	-	-	-
<i>"Anammox bioreactor Anammoxoglobus propionicus"</i>	64 %	72 %	70 %	100 %
<i>"Apterostigma dentigerum fungus garden (APTF)"</i>	72 %	77 %	51 %	-
<i>"Aquatic dechlorinating community (KB-1) (Sample 10166)"</i>	66 %	57 %	54 %	-
<i>"Archaeal virus community from Yellowstone Hot Springs (Crater Hills)"</i>	75 %	-	-	-
<i>"Atta texana internal waste dump (Dump bottom)"</i>	65 %	88 %	71 %	41 %
<i>"Atta texana internal waste dump (Dump top)"</i>	65 %	80 %	70 %	-
<i>"Bison Hot Spring Pool, Yellowstone (05DEC07 BISONN)"</i>	67 %	-	53 %	-
<i>"Endophytic microbiome from Rice"</i>	88 %	77 %	50 %	-
<i>"Guerrero Negro salt ponds hypersaline mat 04(N)"</i>	63 %	-	46 %	46 %
<i>"Guerrero Negro salt ponds hypersaline mat 05(O)"</i>	66 %	-	44 %	-
<i>"Guerrero Negro salt ponds hypersaline mat 09(Y)"</i>	63 %	65 %	52 %	-
<i>"Maize field bulk soil (Bulk soil sample from field growing corn (Zea mays))"</i>	65 %	77 %	54 %	-
<i>"Maize rhizosphere soil (Soil sample from rhizosphere of corn (Zea mays))"</i>	64 %	61 %	55 %	47 %
<i>"Marine anaerobic ammonium oxidizing (anammox) community"</i>	64 %	70 %	48 %	-
<i>"Marine planktonic communities from Hawaii Ocean Times Series Station (HOT/ALOHA) (4_Deep_abyss)"</i>	65 %	-	51 %	-
<i>"Methylophilic community from Lake Washington sediment Methane enrichment"</i>	73 %	72 %	54 %	-
<i>"Methylophilic community from Lake"</i>	63 %	58 %	52 %	48 %

Washington sediment Methanol enrichment"				
"Methylothetic community from Lake Washington sediment Methylamine enrichment"	64 %	80 %	55 %	-
"Methylothetic community from Lake Washington sediment combined (v2)"	64 %	80 %	100 %	-
"Microbial community from Yellowstone Hot Springs (Fairy Spring Red Layer)"	65 %	70 %	55 %	-
"Microbial community from Yellowstone Hot Springs (Mushroom Spring)"	74 %	76 %	53 %	-
"Miscanthus field bulk soil (Bulk soil sample from field growing Miscanthus x giganteus)"	65 %	-	60 %	-
"Miscanthus rhizosphere soil (Rhizosphere soil sample of Miscanthus x giganteus)"	77 %	55 %	66 %	-
"Oak Ridge Pristine Groundwater FRC FW301"	76 %	61 %	63 %	44 %
"Olavius algarvensis endosymbiont metagenome Gamma3"	68 %	-	47 %	-
"Sludge/Australian, Phrap Assembly"	95 %	100 %	100 %	100 %
"Sludge/US, Jazz Assembly"	68 %	72 %	54 %	-
"Sludge/US, Phrap Assembly"	68 %	72 %	65 %	-
"Soil microbial communities from FACE and OTC sites"	65 %	68 %	52 %	54 %
"Soil microbial communities from FACE and OTC sites (FACENCE)"	64 %	74 %	54 %	45 %
"Soil microbial communities from FACE and OTC sites (Maryland Estuary ambient)"	65 %	70 %	52 %	42 %
"Soil microbial communities from FACE and OTC sites (Oak Ridge ambient)"	73 %	-	60 %	-
"Soil microbial communities from FACE and OTC sites (Oak Ridge elevated CO2)"	68 %	80 %	58 %	55 %
"Soil microbial communities from Minnesota Farm"	64 %	59 %	51 %	50 %
"Soil microbial community from switchgrass rhizosphere"	71 %	75 %	50 %	52 %
"Uranium Contaminated Groundwater FW106"	64 %	82 %	48 %	42 %
"Wastewater Terephthalate-degrading communities from Bioreactor"	67 %	78 %	58 %	-
"Wastewater treatment plant Plasmid pool from Switzerland (submission 1086)"	95 %	98 %	100 %	100 %

Resultados

<i>“Wastewater treatment plant Plasmid pool from Switzerland (submission 1087)”</i>	95 %	98 %	100 %	-
<i>“simHC - Simulated High Complexity Metagenome”</i>	91 %	75 %	51 %	46 %
<i>“simLC - Simulated Low Complexity Metagenome”</i>	68 %	80 %	53 %	-
<i>“switchgrass field bulk soil (Bulk soil sample from field growing switchgrass (Panicum virgatum))”</i>	63 %	61 %	54 %	-
<i>“switchgrass rhizosphere soil (Rhizosphere soil sample from switchgrass (Panicum virgatum))”</i>	73 %	61 %	53 %	-

Encontramos una integrasa tipo 1 en el metagenoma *“Air microbial communities Singapore indoor air filters 2”*, la cual podría formar parte de la estructura de un integrón. Sin embargo, no hallamos el resto de los genes pertenecientes al posible integrón tipo 1. Es probable que el resto de la estructura del integrón quedara sin secuenciar o ensamblar.

En otras dos integrasas *intl1* encontradas, correspondientes a los metagenomas *“Endophytic microbiome from Rice”* y *“simHC - Simulated High Complexity Metagenome”*, tampoco localizamos el resto de los genes propios de los integrones tipo 1. El porcentaje de identidad respecto a *intl1* en el primer metagenoma es bajo (88 %) pero se debe al tamaño del *contig*, que no contiene todo el gen, no al alineamiento con *intl1*.

En dos entradas de la Tabla 22, ocurre lo contrario que para las integrasas comentadas anteriormente, encontramos los genes *orf5* y *sul1* en los metagenomas *“Anammox bioreactor Anammoxoglobus propionicus”* y *“Methylophilic community from Lake Washington sediment combined (v2)”* respectivamente, con un porcentaje del 100 %, sin hallar la integrasa tipo 1. El hecho de encontrar los genes *orf5* y *sul1*, sugiere la presencia de integrones tipo 1 en ambos metagenomas.

Encontramos la estructura completa de los integrones tipo 1 en tres metagenomas pertenecientes todos a plantas de tratamiento de aguas residuales. Una de ellas se encuentra en Australia, donde ya sabíamos de la presencia de un integrón tipo 1 por los análisis de búsqueda en las bases de metagenomas consultadas: MG-RAST y CAMERA. Las otras dos plantas de aguas residuales se encuentran en Suiza y junto con la primera, constituyen ambientes contaminados por la actividad del hombre. En los ambientes

naturales, como hemos explicado anteriormente, no es usual encontrar integrones tipo 1. Cuando analizamos los ambientes contaminados, no contaminados y aislado de la actividad humana (véase apartado 4.2), buscando amplificar integrasas tipo 1, descubrimos que lo que menos encontramos fue *intl1*. El conjunto de integrón integrasas diferentes halladas en cada ecosistema fue mucho mayor en comparación con *intl1* a pesar de estar dirigida nuestra búsqueda a encontrar este tipo de integrasas. Lo mismo nos ha sucedido con los resultados obtenidos en las diferentes búsquedas en las bases de datos de metagenomas.

4.6.2.4. Búsqueda en las bases de metagenomas GOLD y NCBI

La base de metagenomas GOLD contiene actualmente, 281 proyectos de metagenomas asociados, de los cuales se puede obtener diferente información pero sin embargo, no permite la comparación contra los distintos metagenomas. De estos 281 metagenomas, 159 están accesibles mediante la página del NCBI y contra éstos se pudieron buscar los genes presentes en los integrones tipo 1. En todos los casos en los que aparecía integrasas tipo 1, los metagenomas eran los ya descritos en los apartados 4.6.2.1, 4.6.2.2 y 4.6.2.3. Por ese motivo los resultados no se muestran.

4.6.3. Búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas

Se realizó una búsqueda de integrón integrasas de bacterias no cultivadas en la base de proteínas del PubMed – NCBI con los términos: “*integron integrases uncultured bacterium*”, localizándose un total de 116 anotaciones de secuencias de integrasas. Las 116 secuencias fueron extraídas y comparadas entre sí, encontrando 10 grupos diferentes dentro de los cuales se pueden agrupar las distintas integrón integrasas pertenecientes a bacterias que no han sido cultivadas.

En la Fig. 16 podemos ver el alineamiento de los 10 grupos de integrón integrasas caracterizados hasta el momento. En el alineamiento está incluida *intl1*, observándose así las distintas zonas conservadas que presentan las

integradas. Al mismo tiempo, encontramos diferencias entre las secuencias de integrasas en comparación con la integrasa tipo 1 (*int1*).

Comparando éste alineamiento con las integrón integrasas obtenidas en los ambientes naturales analizados en este estudio, podemos decir que los resultados son similares (véase Fig. 9). Las zonas conservadas de las distintas integrasas son idénticas en todas ellas así como las zonas de más variabilidad por lo que nuestros resultados se corresponderían por tanto, con los análisis de las secuencias depositadas en las bases de datos.

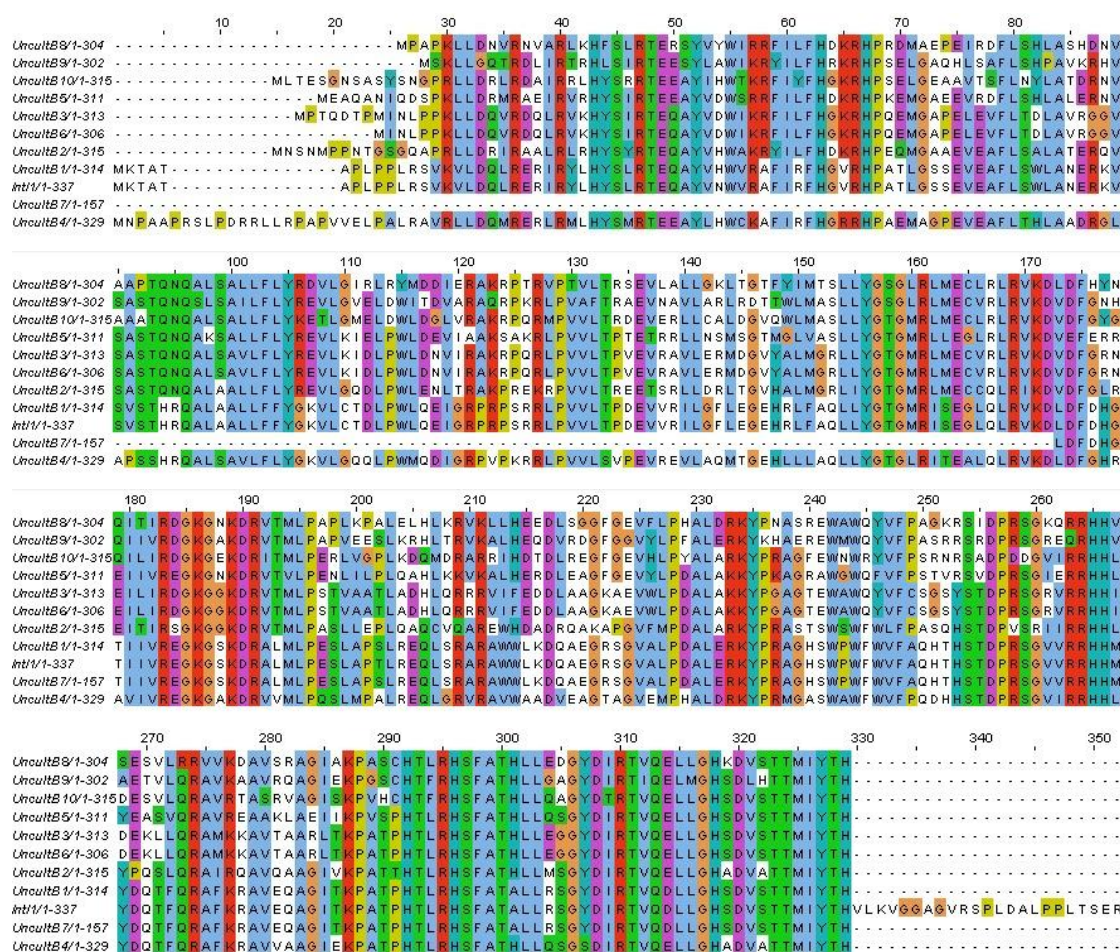


Fig. 16. Alineamiento de las integrón integrasas pertenecientes a bacterias no cultivadas encontradas en la red.

En el alineamiento está incluida *int1*, observándose las distintas zonas que comparten las integrasas así como las diferencias en base a la secuencia de proteínas.

Las integrón integrasas pertenecientes a bacterias no cultivadas se han encontrado en diferentes metagenomas entre los que podemos citar:

1. “*agricultural soil near pig farm*”, no publicado.
2. “*freshwater biofilm*” (Gillings *et al.* 2009a).
3. “*activated sludge basin of a wastewater treatment plant*” (Szczepanowski *et al.* 2005; Tennstedt *et al.* 2005).
4. “*non-culturable bacteria from soil*” (Nield *et al.* 2001).
5. “*Suez Bay sediment*”, no publicado.
6. “*Tar Pond*”, no publicado.

El estudio de las integrón integrasas encontradas en el metagenoma “*agricultural soil near pig farm*” no ha sido todavía publicado pero en artículos recientes se ha demostrado la presencia del gen *aadA*, amplificando las regiones conservadas 5' y 3' de los integrones tipo 1, en muestras de suelos abonados con estiércol de cerdo como fuente de abono orgánico (Binh *et al.* 2009), por lo que pudiera deducirse que en este metagenoma, los integrones hayan sido introducidos debido a que la muestra de suelo está localizada cerca de una granja de cerdos. De hecho la integrasa encontrada en este metagenoma es la denominada UncultB1 cuyo fragmento amplificado es idéntico a *intl1*. Esta integrón integrasa posiblemente podría tratarse de una integrasa tipo 1 encontrada en este ecosistema.

Gillings y colaboradores encontraron en el metagenoma “*freshwater biofilm*” en Australia, integrones que no eran tipo 1, presentes hasta el momento en ambientes naturales, asociados al gen *qac*, por lo que demuestran un intercambio de genes que forman parte de la estructura de los integrones entre el ambiente clínico y no clínico. Tienen en cuenta en la extracción de la muestra que no hay ni hospitales, ni plantas industriales de tratamientos ni producción animal cerca de la recogida de muestra.

El metagenoma “*activated sludge basin of a wastewater treatment plant*” es un ecosistema contaminado en el que la presencia de *intl1* pudiera ser consecuencia de la actividad humana. El segmento amplificado de la integrasa designada como UncultB7 encontrado en este metagenoma, es exactamente igual a la integrasa tipo 1. Lo mismo sucede para los metagenomas “*Suez Bay sediment*” y “*Tar Pond*”, ecosistemas contaminados por la mano del hombre en los que la introducción de *intl1* es consecuencia probablemente de su introducción por vía humana.

En el artículo de Nield y colaboradores, encuentran integrón integrasas en el metagenoma “*non-culturable bacteria from soil*” del cual plantean que no tienen conocimiento de que este suelo haya estado expuesto a la acción por los antibióticos. Los autores hallan, al igual que nosotros en el análisis de los ambientes contaminados, no contaminados y alejados de la actividad humana, una gran diversidad de integrasas de origen medioambiental amplificando las regiones conservadas de los integrones.

4.6.4. Búsqueda del gen *aadA1* en bases de metagenomas y en bacterias no cultivadas

En la búsqueda del gen *intI1* en genomas completos y parciales, y posteriormente de los genes que forman parte de la organización típica de los integrones tipo 1, se observó la presencia del gen *aadA1* de resistencia a estreptomicina y espectinomicina, asociado en muchos casos, a la estructura de los integrones (véase Fig. 15). Teniendo en cuenta los datos bioinformáticos obtenidos, así como los resultados de la amplificación de las regiones centrales de los ambientes contaminados y no contaminados analizados en este estudio (véase apartado 4.2), donde se encontró el gen *aadA1* flanqueado por las regiones conservadas 5' y 3' de los integrones, decidimos realizar una búsqueda de este gen en bases de metagenomas y en secuencias de bacterias no cultivadas anotadas.

El gen *aadA1* se encontró en los siguientes metagenomas:

- “*US Phosphorus Removing (EBPR) Sludge*”, US.
- “*Australian Phosphorus Removing (EBPR) Sludge*”, Australia.
- “*Air microbial communities Singapore indoor air filters 2*”
- “*Wastewater treatment plant Plasmid pool from Switzerland (submission 1087)*”
- “*simHC - Simulated High Complexity Metagenome*”

En todos los metagenomas en los que encontramos el gen *aadA1*, habíamos localizado también otros genes pertenecientes a la estructura de los integrones tipo 1, como se ha mostrado en los apartados 4.6.2.1, 4.6.2.2 y 4.6.2.3. En todos los casos, hallamos o uno o varios de los genes que forman parte de los integrones tipo 1, confirmando así la presencia de integrones *intI1* en estos ecosistemas. Ahora podemos decir que estos integrones tipo 1

encontrados podrían estar asociados con el gen *aadA1* de resistencia a estreptomicina y espectinomicina.

Buscando el gen *aadA1* en la base de proteínas del PubMed – NCBI utilizando como palabras claves: “*aadA1 uncultured bacterium*”, hallamos otros ecosistemas en los que encontramos *aadA1*, dos de ellos corresponden a investigaciones que no han sido publicadas todavía.

Los metagenomas son:

- “*soil amended with sewage sludge*”, no publicado.
- “*Mahananda river water*”, no publicado.
- “*ornamental fish carriage water sample*” (Verner-Jeffreys *et al.* 2009).
- “*piggery manure in agricultural soils*” (Binh *et al.* 2009).

Los metagenomas no publicados son ecosistemas contaminados por el hombre en los que probablemente la presencia de bacterias patógenas sea usual, sobre todo en el “*Mahananda river water*” de la India.

En el metagenoma “*ornamental fish carriage water sample*” se clonaron fragmentos obtenidos por PCR de los genes que forman parte de los integrones tipo 1, al igual que en este estudio cuando analizamos los ambientes contaminados, no contaminados, aislado de la actividad humana y del intestino humano. Al secuenciar los fragmentos obtuvieron, entre otros genes, el gen *aadA1* y *qac*, considerándose un reservorio de genes de resistencia (Verner-Jeffreys *et al.* 2009).

El gen *aadA1* fue localizado también en aquellos suelos que han sido abonados recientemente. En este estudio demuestran como el gen *aadA1* asociado a integrones tipo 1 es introducido en los suelos agrícolas como consecuencia de la fertilización con abono orgánico a base de estiércol de cerdo. De esta forma, los integrones podrían transferirse, una vez en el suelo, a otros microorganismos o directamente pasar, en sus bacterias originales, a los animales o al hombre mediante el agua, por ejemplo (Binh *et al.* 2009).

4.6.5. Creación de una base de secuencias de integrasas, de sitios *attC* y programas accesorios para el análisis

Confeccionamos una base de datos de secuencias de integrasas agrupando la familia completa a la que pertenecen las integrasas. La base de datos de integrasas está formada por un total 7891 secuencias. Todas ellas fueron comparadas con los siguientes metagenomas: intestino humano, suelo y restos de ballena.

Los resultados obtenidos pueden ser consultados accediendo a la página web (http://silvani.cnb.uam.es/integrases_metagenomics.html), en la que todavía estamos trabajando.

En el metagenoma del intestino humano se encontraron 55 integrasas, en el metagenoma del suelo, 135 integrasas y en el de restos de ballena, 68 integrasas. Los porcentajes de identidad de cada una de las integrasas con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos, se muestran en la Tabla 23 (intestino humano), Tabla 24 (suelo) y Tabla 25 (restos de ballena).

Tabla 23. Integrasas halladas en el metagenoma del intestino humano con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.

Integrasas obtenidas en el metagenoma del intestino humano con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos	
<i>Methanobrevibacter smithii</i> (98,20 %)	<i>Ruminococcus torques</i> (91,46%)
<i>Methanobrevibacter smithii</i> (79,31 %)	<i>megaplásmido pHG 1</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> (39,61 %)
<i>Bacteroides capillosus</i> (57,45 %)	<i>Dorea longicatena</i> (100 %)
<i>Clostridium leptum</i> (69,28 %)	<i>Ruminococcus gnavus</i> (69,91 %)
<i>Clostridium leptum</i> (58,43 %)	<i>Clostridium difficile</i> (93,42 %)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (100 %)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (81,66 %)
<i>Dehalococcoides sp.</i> (58,55 %)	<i>Ruminococcus torques</i> (88,02 %)
<i>Dorea longicatena</i> (61,33 %)	<i>megaplásmido pHG 1</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> (42,86 %)
<i>Bifidobacterium longum</i> (98,41 %)	<i>Syntrophomonas wolfei</i> (47,40 %)
<i>Methanobrevibacter smithii</i> (62,71 %)	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (31,61 %)
<i>Eubacterium ventriosum</i> (53,33 %)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (49,42 %)
<i>Thiobacillus denitrificans</i> (53,04 %)	<i>Clostridium leptum</i> (56,99 %)
<i>Ruminococcus obeum</i> (59,33 %)	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (33,86 %)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (100 %)	<i>Clostridium leptum</i> (54,07 %)
<i>Lactobacillus sakei</i> (54,14 %)	<i>Dorea longicatena</i> (53,76 %)
<i>Clostridium beijerinckii</i> (82,76 %)	<i>Dorea longicatena</i> (100 %)
<i>Clostridium leptum</i> (96,49 %)	<i>Dorea longicatena</i> (100 %)
<i>Bifidobacterium longum</i> (100 %)	<i>Bacillus licheniformis</i> (48,45 %)
<i>Ruminococcus obeum</i> (67,05 %)	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98 %)
<i>Clostridium difficile</i> (97,95 %)	<i>Ruminococcus obeum</i> (49,09 %)

<i>Shewanella denitrificans</i> (35,71 %)	<i>Clostridium leptum</i> (45,03 %)
<i>Parabacteroides merdae</i> (71,70 %)	<i>Bacteroides ovatus</i> (43,08 %)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (68,15 %)	<i>Lactobacillus reuteri</i> (38,96 %)
<i>Bifidobacterium longum</i> (100 %)	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> (44,58 %)
<i>Bifidobacterium longum</i> (100 %)	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (44,51 %)
<i>Ruminococcus obeum</i> (53,33 %)	<i>Rhodococcus sp.</i> (45,03 %)
<i>plásmido pRHL1,</i> <i>Rhodococcus sp.</i> , (45,03 %)	<i>Bacteroides capillosus</i> (38,26 %)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (96,88%)	

Algunos de las integrasas homólogas de las integrasas encontradas se han descrito localizadas en plásmidos. Los plásmidos pRHL1 y pRHL2 de *Rhodococcus sp.*, contienen en su estructura secuencias de inserción, transposasas y, 1,146 y 454 proteínas respectivamente, involucradas en el catabolismo celular (McLeod *et al.* 2006).

El plásmido pSymA *Rhizobium meliloti*, contiene genes implicados en simbiosis, en el metabolismo del nitrógeno y carbono, transporte, estrés, entre otras muchas funciones que explican la colonización y adaptación de este microorganismo en el suelo (Barnett *et al.* 2001).

Por último el megaplásmido pHG1 de *Ralstonia eutropha* tiene 429 potenciales genes, muchos de ellos relacionados con la litoautotrofia de esta bacteria, anaerobiosis, denitrificación, entre otras funciones. Los grupos de genes funcionalmente conectados están flanqueados por elementos que favorecen la movilidad como secuencias de inserción, transposasas e integrasas. Se encontraron 22 marcos de lectura abierta pertenecientes a integrasas/recombinasas en este plásmido (Schwartz *et al.* 2003). Las otras integrasas halladas en los metagenomas del suelo, intestino humano y restos de ballena asociadas a plásmidos, pertenecen a estudios que no han sido publicados todavía. Ninguna de las integrasas encontradas es una integrasa tipo 1.

Tabla 24. Integrasas halladas en el metagenoma del suelo con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.

Integrasas obtenidas en el metagenoma del suelo con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos	
<i>Burkholderia xenovorans</i> (69,17 %)	Microorganismo ND (52,38 %)
<i>Rhizobium loti</i> (50,60 %)	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (56,86 %)
<i>Pelobacter carbinolicus</i> (46,38 %)	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (37,37 %)
<i>Geobacter uraniireducens</i> (60 %)	<i>megaplásmido pHG1,</i> <i>Ralstonia eutropha</i> (45,09 %)
<i>Moorella thermoacetica</i> (24,86 %)	<i>Methylobacillus flagellatus</i> (74,49 %)
Bacteria no cultivada (74,19 %)	<i>Pelobacter propionicus</i> (57,14 %)

Resultados

<i>Clostridium</i> sp, (43,94 %)	<i>Lactobacillus salivarius</i> (47,26 %)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (81,82 %)	<i>Desulfotomaculum reducens</i> (45,51 %)
<i>Geobacter sulfurreducens</i> (52,22 %)	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (72,55 %)
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> (76,65 %)	<i>Bradyrhizobium</i> sp, (49,30 %)
<i>Shigella flexneri</i> (40,38 %)	<i>Rhizobium loti</i> (61,20 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (38,37 %)	Bacteria no cultivada (57,47 %)
Microorganismo ND (45,45 %)	<i>plásmido pACRY02,</i> <i>Acidiphilium cryptum</i> (51,85 %)
<i>Dehalococcoides</i> sp, (36,77 %)	<i>Desulfotomaculum reducens</i> (42,34 %)
<i>Myxococcus Xanthus</i> (67,33 %)	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> (42,20 %)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (44,38 %)	Microorganismo ND (62,28 %)
<i>Syntrophomonas wolfei</i> (52,91 %)	<i>Solibacter usitatus</i> (45,57 %)
<i>Erythrobacter litoralis</i> (62,35 %)	<i>Marinobacter</i> sp, (47,97 %)
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (40,52 %)	<i>Nitrobacter</i> sp, (36,36 %)
<i>plásmido pRSPA01,</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (48,84 %)	<i>plásmido pSymA,</i> <i>Rhizobium meliloti</i> (53,57 %)
<i>Stigmatella aurantiaca</i> (59,55 %)	<i>Rhizobium loti</i> (53,75 %)
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (48,48 %)	Microorganismo ND (60,13 %)
Microorganismo ND (35,00 %)	<i>Stigmatella aurantiaca</i> (40,80 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (48,24 %)	Bacteria no cultivada (66,34 %)
<i>Moorella thermoacetica</i> (49,01 %)	<i>Flavobacteria bacterium</i> (40,52 %)
<i>Nocardioide</i> sp, (81,37 %)	<i>Bacillus cereus</i> (56,10 %)
Microorganismo ND (50 %)	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> (40,72 %)
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> (61,35 %)	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (52,06 %)
Microorganismo ND (45,33 %)	<i>Azoarcus</i> sp, (45,86 %)
Microorganismo ND (52,53 %)	<i>Nitrobacter</i> sp, (39,13 %)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (61,40 %)	Microorganismo ND (47,73 %)
<i>Planctomyces maris</i> (52,02 %)	Microorganismo ND (51,75 %)
<i>Stigmatella aurantiaca</i> (60,57 %)	Microorganismo ND (63,20 %)
<i>Burkholderia xenovorans</i> (55,56 %)	Microorganismo ND (50,32 %)
<i>Nitrococcus mobilis</i> (60,61 %)	<i>Ruminococcus obeum</i> (57,38 %)
<i>Arthrobacter aurescens</i> (70,21 %)	<i>Moorella thermoacetica</i> (40,58 %)
<i>Geobacter metallireducens</i> (64,42 %)	<i>Stigmatella aurantiaca</i> (59,76 %)
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (50,62 %)	<i>Plesiocystis pacifica</i> (59,52 %)
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> (48,24 %)	<i>Acinetobacter</i> sp, (58,06 %)
Microorganismo ND (55,56 %)	Microorganismo ND (44,21 %)
Microorganismo ND (57,74 %)	<i>Robiginitalea biformata</i> (37,57 %)
Bacteria no cultivada (50 %)	<i>Plesiocystis pacifica</i> (51,43 %)
Microorganismo ND (36,81 %)	<i>Flavobacteria bacterium</i> (45 %)
<i>plásmido pRHL2,</i> <i>Rhodococcus</i> sp, (79,59 %)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (60 %)
<i>Methylobacillus flagellatus</i> (69,91 %)	<i>Janthinobacterium</i> sp, (49,70 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (55,29 %)	<i>Bacteroides uniformis</i> (49,61 %)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (42,94 %)	<i>Parabacteroides merdae</i> (76,25 %)
Microorganismo ND (61,11 %)	<i>Polaromonas</i> sp, (48,44 %)
Microorganismo ND (47,62 %)	Microorganismo ND (68,09 %)
<i>Blastopirellula marina</i> (52,48 %)	<i>Polaribacter igransii</i> (54,49 %)
<i>Moorella thermoacetica</i> (30,88 %)	<i>Methanobacterium phage</i> (24,86 %)
<i>Robiginitalea biformata</i> (63,16 %)	<i>Magnetospirillum magneticum</i> (59,66 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (57,98 %)	<i>Sphingomonas</i> sp, (67,91 %)

<i>Syntrophomonas wolfei</i> (45,86 %)	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> (41,77 %)
Microorganismo ND (61,33 %)	<i>Robiginitalea biformata</i> (37,43 %)
<i>megaplásmido pHG1</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> (51,31 %)	<i>Bacteroides vulgatus</i> (49,31 %)
<i>plásmido pSWIT01</i> , <i>Sphingomonas wittichii</i> (54,84 %), <i>Leptospirillum rubrum</i> (58,27 %)	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (50 %)
<i>Rhizobium loti</i> (43,72 %)	Bacteria no cultivada (55,28 %)
<i>marine actinobacterium</i> (58,58 %)	<i>plásmido FB24-3</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> (60,42 %), <i>Dechloromonas aromatica</i> (58,99 %)
<i>Mycobacterium sp.</i> (33,93 %)	<i>plásmido QpH1</i> , <i>Coxiella burnetii</i> (53,01 %)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (54,29 %)	<i>Solibacter usitatus</i> (57,26 %)
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (62,20 %)	<i>Mesorhizobium sp.</i> (60,13 %)
<i>Croceibacter atlanticus</i> (58,82 %)	Microorganismo ND (68,75 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (61,36 %)	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (49,49 %)
<i>Solibacter usitatus</i> (62,20 %)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (39,75 %)
<i>megaplásmido pHG1</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> (57,45 %)	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (53,19 %)
<i>Bacillus sp.</i> (47,37 %)	

ND: no determinado.

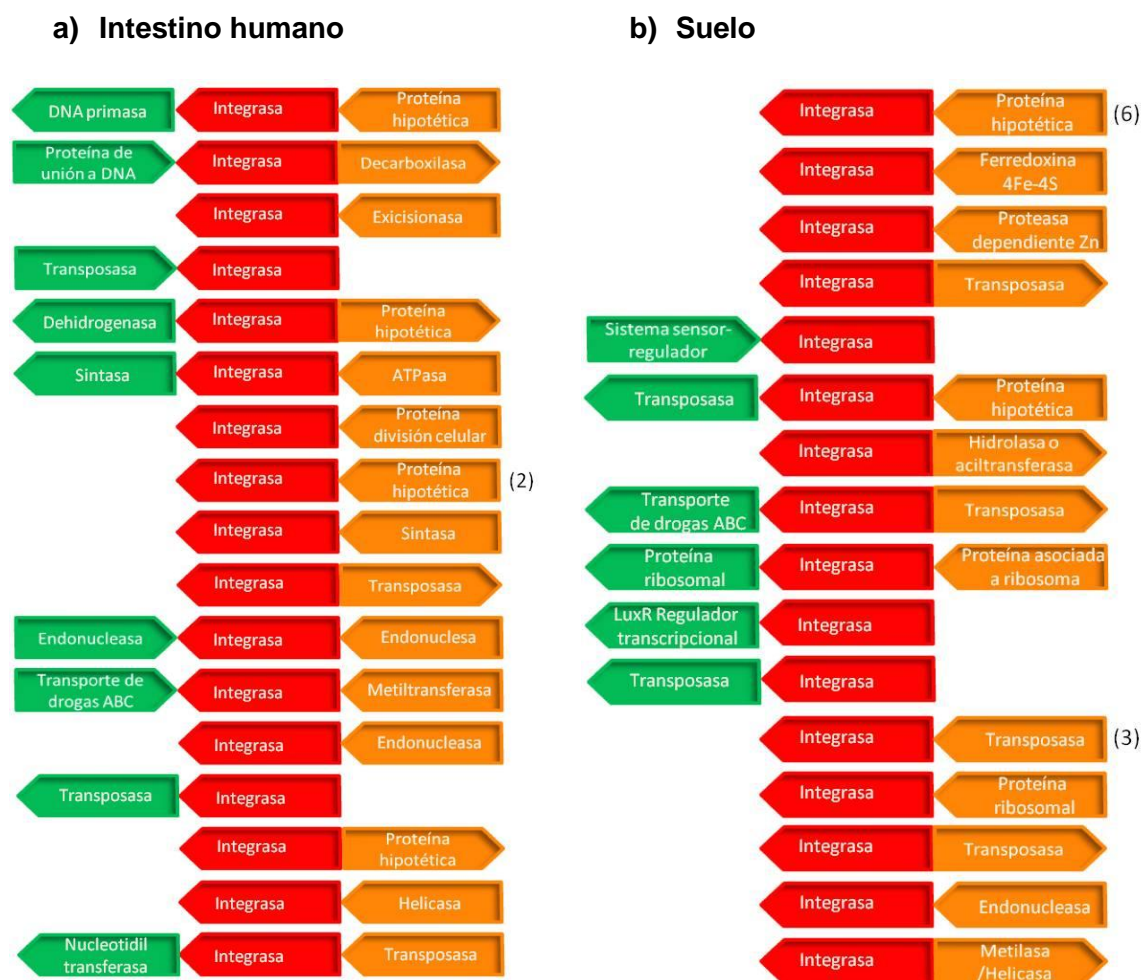
Tabla 25. Integrasas halladas en el metagenoma de restos de ballena con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.

Integrasas obtenidas en el metagenoma de restos de ballena con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos	
<i>Arcobacter butzleri</i> (55,08 %)	<i>Bermanella marisrubri</i> (72,73 %)
<i>Roseobacter sp.</i> (62,73 %)	<i>Hyphomonas neptunium</i> (85,83 %)
<i>Marinobacter sp.</i> (46,86 %)	Microorganismo ND (81,25 %)
<i>Sulfurimonas denitrificans</i> (85,19 %)	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> (67,48 %)
<i>Sulfurovum sp.</i> (55,56 %)	<i>Marinobacter sp.</i> (57,58 %)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (58,28 %)	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> (72,62 %)
<i>Mesorhizobium sp.</i> (54,27 %)	Microorganismo ND (42,02 %)
<i>Congregibacter litoralis</i> (62,73 %)	<i>Hyphomonas neptunium</i> (77,27 %)
<i>Oceanicaulis alexandrii</i> (38,04 %)	<i>Marinobacter sp.</i> (86,23 %)
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (58,08 %)	<i>Psychrobacter arcticus</i> (96,39 %)
<i>Bradyrhizobium sp.</i> (41,57 %)	<i>Roseovarius sp.</i> (40,83 %)
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> (71,43 %)	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> (65,61 %)
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> (47,40 %)	<i>Congregibacter litoralis</i> (64,60 %)
<i>Pelobacter propionicus</i> (43,21 %)	Microorganismo ND (48,72 %)
Microorganismo ND (40,59 %)	<i>Bacteroides uniformis</i> (64,58 %)
<i>Bacillus cereus</i> (27,70 %)	<i>Shewanella frigidimarina</i> (96,30 %)
<i>Arcobacter butzleri</i> (47,02 %)	<i>Croceibacter atlanticus</i> (60 %)
<i>Haemophilus somnus</i> (69,57 %)	Microorganismo ND (47,13 %)
<i>Neptuniibacter caesariensis</i> (55,42 %)	<i>Microscilla marina</i> (48,67 %)
<i>Croceibacter atlanticus</i> (57,45 %)	<i>Sulfurovum sp.</i> (54,96 %)
<i>Hyphomonas neptunium</i> (89,61 %)	<i>Vibrio vulnificus</i> (100 %)
Bacteria no cultivada (65,82 %)	Microorganismo ND (63,16 %)

<i>Dechloromonas aromatica</i> (40,80 %)	<i>Vibrio splendidus</i> (76,76 %)
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> (71,15 %)	Microorganismo ND (100 %)
<i>Pelobacter propionicus</i> (41,15 %)	<i>delta proteobacterium</i> (47,56 %)
<i>Legionella pneumophila</i> (51,76 %)	<i>Paracoccus denitrificans</i> (66,67 %)
<i>Gramella forsetii</i> (66,86 %)	<i>Bacteroides uniformis</i> (63,35 %)
<i>Sulfurovum sp.</i> (41,21 %)	<i>Marinobacter sp.</i> (43,26 %)
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> (60,31 %)	<i>Gramella forsetii</i> (68,48 %)
<i>Picrophilus torridus</i> (46,15 %)	<i>Marinobacter sp.</i> (46,15 %)
<i>Chromobacterium violaceum</i> (57,67 %)	<i>Flavobacteriales bacterium</i> (47,78 %)
<i>Bermanella marisrubri</i> (41,46 %)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (50,30 %)
Microorganismo ND (53,03 %)	<i>Pseudomonas mendocina</i> (69,17 %)
<i>Sulfurimonas denitrificans</i> (72,37 %)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> (58,62 %)

ND: no determinado.

Muchas integrasas ocupaban el tamaño completo del *contig* pero en los *contigs* más grandes se pudieron ver los genes que se encontraban flanqueando las integrasas. En la Fig. 17 podemos observar los entornos genéticos diferentes encontrados en los tres metagenomas analizados.



c) Restos de ballena

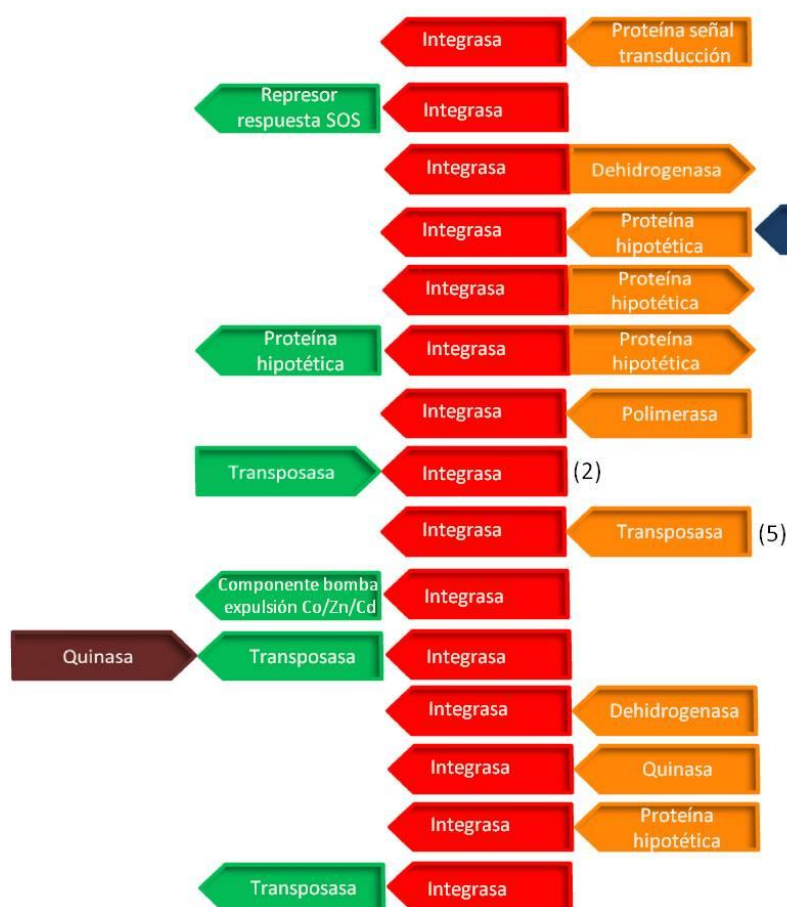


Fig. 17. Entornos genéticos diferentes encontrados en los metagenomas: intestino humano, suelo y restos de ballena.

En la figura puede observarse los diferentes genes hallados alrededor de las integrasas en los diferentes metagenomas investigados: a) intestino humano, b) suelo y c) restos de ballena. Muchas de las integrasas están asociadas a elementos de transposición que le permiten movilidad entre los microorganismos. Los números representan la cantidad de veces en los que fue encontrada idéntica combinación de genes.

En el intestino humano podemos destacar aquellas integrasas ligadas a transposasas, elementos para la transposición, que garantizan su movilidad entre los diferentes microorganismos. Encontramos también una integrasa al lado de un sistema de transporte de drogas tipo ABC.

En el metagenoma del suelo, hallamos del mismo modo integrasas flanqueadas por transposasas. También es importante destacar los genes: sistema sensor regulador, transporte de drogas tipo ABC y el regulador

transcripcional LuxR, situados al lado de las integrasas. En la posible estructura de los integrones (genes en color naranja) encontramos muchas proteínas hipotéticas. También encontrábamos proteínas hipotéticas cuando analizamos los ambientes contaminados, no contaminados y alejados de la actividad humana.

En el metagenoma de restos de ballenas localizamos a un represor de la respuesta SOS flanqueando a una integrasa. Estudios recientes en integrones cromosomales e integrones movilizables han revelado la presencia de un motivo conservado, situado en la zona promotora de la integrasa y que corresponde a un sitio de unión de LexA en *Escherichia coli* (Guerin *et al.* 2010). LexA es un represor transcripcional que controla la respuesta SOS, un sistema regulador que repara los daños en el DNA (Erill *et al.* 2007) que puede ser inducido por múltiples señales activadas por daños provocados en el DNA (Aertsen and Michiels 2006). En los últimos años, se ha visto que la respuesta SOS puede favorecer la adquisición de numerosos fenotipos de relevancia clínica como por ejemplo la activación y diseminación de factores de virulencia en bacteriófagos (Kimmitt *et al.* 1999; Waldor and Friedman 2005), transposones, islas de patogenicidad y elementos conjugativos que codifican genes de resistencia a los antibióticos (Roberts and Kleckner 1988; Kuan *et al.* 1991; Beaber *et al.* 2004; Ubeda *et al.* 2007). También se ha demostrado que los antibióticos como las fluoroquinolonas o los β -lactámicos, puede inducir la respuesta SOS (Kelley 2006; Erill *et al.* 2007).

Se ha descrito que la inducción de la respuesta SOS, incrementa la expresión de la integrasa, controlando así la integración y excisión de cassettes en el integrón (Guerin *et al.* 2010). Teniendo en cuenta que la respuesta SOS puede ser inducida por diferentes situaciones de stress, tanto la reordenación de los cassettes presentes en el integrón como la adquisición de material genético exógeno, ocurriría cuando la célula necesite realizar un cambio o una innovación (Cambray *et al.* 2010).

También encontramos, en el metagenoma de restos de ballena, una integrasa al lado de una bomba de expulsión y al igual que en los otros dos metagenomas estudiados, integrasas flanqueadas por transposasas.

Una base de datos con posibles sitios *attC*, blancos de acción de las integrasas para la recombinación sitio-específica e incorporación de los cassettes génicos, fue confeccionada con el objetivo de localizar potencialmente cassettes génicos fue comparada con los metagenomas mencionados anteriormente. En la Tabla 26 se muestran los distintos posibles

cassettes hallados para cada uno de los metagenomas comparados: a) intestino humano, b) suelo y c) restos de ballena.

Tabla 26. Posibles cassettes encontrados en los metagenomas: intestino humano, suelo y restos de ballenas.

a)

Posibles cassettes encontrados en el metagenoma del intestino humano	
Helicasa	Endonucleasa
Hidrolasa	Peptidasa
Proteína hipotética	ATPasa
Permeasa, transporte tipo ABC	Corismato mutasa
Dehidratasa	Regulador transcripcional
Sintasa	Dehidrogenasa
Exopolifosfatasa	Fosfotransferasa
Fosforilasa	Quinasa
Polimerasa	Transportador de cationes (Co/Zn/Cd)
Metiltransferasa	

b)

Posibles cassettes encontrados en el metagenoma del suelo	
Proteína hipotética	Dehidrogenasa
Reductasa	Oxidoreductasa
Adenililtransferasa	Proteína ribosomal
Fosforibosiltransferasa	Carboxilasa
Mutasa	DNasa dependiente de Mg
Regulador	Celobiosa fosforilasa
Integrasa	Exonucleasa
Proteína traslocadora	Glicosiltransferasa
Transferasa	Sintasa
Metiltransferasa	Transporte de Fe^{3+} , tipo ABC
Polimerasa	Celulasa
Aminopeptidasa	ATPasa
Transposasa	Quinasa
Aspartato/glutamato deacilasa	Oxidasa
Proteína señalizadora transducción	Gluconolactonasa
Sistema de transporte de péptidos antimicrobianos tipo ABC	Carboxipeptidasa (proteína de unión penicilina)
Proteína transducción de señal	Fosforilasa
Sistema de transporte fosfato, tipo ABC	Sintetasa

Aciltransferasa	Helicasa
Proteína de membrana	Proteasa
Sistema de transporte K ⁺ , tipo Kef	Deaminasa

c)

Posibles cassettes encontrados en el metagenoma de restos de ballena	
Proteína hipotética	Hidrolasa
Enolasa	Dehidrogenasa
Metiltransferasa	Proteína ribosomal
Proteína reguladora de respuesta con dominio GGDEF	Transportador dipéptidos, oligopéptidos y Ni, tipo ABC
Regulador transcripcional	Transcriptasa
Ciclohidrolasa	Fosfotransferasa
Proteína de membrana	Transportador MFS
Diguanilato ciclasa con dominio sensor PAS/PAC	Exportador antibióticos/bacteriocinas, tipo ABC
Sintasa	Peroxiredoxina
Reductasa	Glicosiltransferasa
Quinasa	Bomba de expulsión múltiple de drogas
Peptidasa	Proteína de transporte de Fe
Sistema de transporte múltiple de drogas, tipo ABC	Sistema transporte dipéptidos, tipo ABC
Polimerasa	Proteína de membrana OmpA
Integrasa	Transposasa
Sistema de transporte tipo ABC involucrado en la resistencia a solventes orgánicos, etc.	Proteína transportadora de lípidos/oliquétido ciclasa
Regulador de respuesta	Aciltransferasa
Componente ATPasa de transportador ABC	

Los resultados obtenidos de los diferentes cassettes en los ambientes del intestino humano, suelo y restos de ballenas, evidencian una vez más la enorme diversidad de cassettes que podemos encontrar. De igual manera, hallamos cassettes relacionados con mecanismos implicados en resistencia a infinidad de compuestos, incluyendo los antibióticos, como proteínas transportadoras, sistema de transporte ABC, porinas, etc., y enzimas involucradas en funciones metabólicas y de equilibrio celular, que pudieran actuar como proteínas modificadoras tanto de antibióticos como a otros

compuestos. Estas enzimas estarían así vinculadas, del mismo modo, con diferentes fenotipos de resistencia.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por diferentes autores cuando han explorado la presencia de integrones y cassettes génicos en diversos ambientes (Barlow and Gobius 2006; Stokes *et al.* 2006; Elsaied *et al.* 2007; Xu *et al.* 2007a; Gillings *et al.* 2008) y han encontrado muchos cassettes con funciones desconocidas (proteínas hipotéticas o sin homología conocida) o desempeñando funciones relacionadas con el metabolismo y adaptación de las bacterias. Estos estudios nos indican que los integrones no están exclusivamente dedicados a la resistencia antibiótica sino que también juegan un papel importante dentro de la célula. En los resultados obtenidos para las regiones centrales amplificadas en las muestras contaminadas, no contaminadas y aisladas de la actividad humana, obteníamos del mismo modo, gran variedad de cassettes asociados directa o indirectamente con la resistencia a los antibióticos.

Se ha planteado que el número de genes de resistencia a los antibióticos es bajo en comparación con la variedad de cassettes encontrados en las muestras ambientales (Stokes *et al.* 2001; Michael *et al.* 2004), lo que se correspondería con nuestros resultados. El análisis de los integrones con la resistencia a los antibióticos así como su papel en la diseminación de éstos genes, es el resultado de un gran número de investigaciones enfocadas en la búsqueda de estos elementos en el ambiente clínico. Parece ser que en la naturaleza, los integrones desempeñan una función mucho más amplia que la de constituir elementos de captura de genes de resistencia, de ahí la importancia de buscar estos elementos genéticos en diferentes ambientes naturales.

4.7. Búsqueda de genes de resistencia en ambientes extremos

4.7.1. Determinación de la CMI a antibióticos y biocidas en la cepa de *E. coli* EPI300

Se determinó la CMI de la cepa *E. coli* EPI300 frente a los antibióticos y biocidas que posteriormente fueron utilizados para la selección de clones resistentes. En la Tabla 27 se muestra la CMI de la cepa *E. coli* EPI300 obtenida para cada antibiótico y biocida probados.

Tabla 27. Concentración mínima inhibitoria de la cepa *E. coli* EPI300 a antibióticos y biocidas.

ANTIBIÓTICOS Y BIOCIDAS	CMI <i>E. coli</i> EPI300 (µg/mL)
Antibióticos	
Amikacina	2
Kanamicina	2
Ceftazidima	0,5
Ácido Nalidíxico	2
Norfloxacin	0,03
Ofloxacin	0,015
Biocidas	
Triclosan	0,03
Benzalconio	32
Hexaclorofeno	64

4.7.2. Selección de clones resistentes a antibióticos y biocidas y determinación de la CMI

La selección de clones resistentes en las genotecas se realizó utilizando el doble, el cuádruple, etc. de la CMI de la cepa *E. coli* EPI300. Se seleccionaron un total de 69 clones resistentes a los diferentes antibióticos y biocidas testados. La Tabla 28 resume el número de clones seleccionados en cada genoteca así como la concentración usada de antibiótico o biocida según el caso.

Tabla 28. Selección de clones resistentes en genotecas procedentes de ambientes extremos.

	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	GENOTECA	NÚMERO DE CLONES
Antibióticos			
Amikacina	4	Anr26	5
	4	KB1	5
	4	MMK	5
Kanamicina	4	Anr26	1
	4	MMK	5
	512	KB1	7
	1024	KB1	3
Ceftazidima	1	KB1	5
	1	MMK	5
Norfloxacin	0,12	Anr26	3
Biocidas			
Triclosan	0,06	MMK	5
Hexaclorofeno	128	KB1	5
Benzalconio	64	Anr26	5
	64	KB1	5
	64	MMK	5

A los clones seleccionados se les determinó la CMI, además, frente a los antibióticos polimixina, tetraciclina, imipenem y gentamicina para ver si presentaban resistencia cruzada a otros antibióticos de interés clínico. En la Tabla 29 se muestra la CMI relativa de los clones seleccionados. Los valores están referidos respecto a la cepa silvestre *E. coli* EPI300.

Tabla 29. Concentración mínima inhibitoria de los clones seleccionados.

Selector AB / Biocida de los clones	AK	KM	CZ	NF	TRI	BZ	HX	PO	TE	IMI	GE
Amikacina											
AK4-ANR (1)	4X	4X	=	=	=	=	=	=	=	2X	=
AK4-ANR (2)	2X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
AK4-ANR (3)	2X	4X	2X	=	=	=	=	=	=	=	2X
AK4-ANR (4)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	2X	2X
AK4-ANR (5)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	2X
AK4-KB1 (1)	4X	1024X	=	=	=	=	=	=	=	2X	4X
AK4-KB1 (2)	2X	1024X	=	=	=	=	=	=	=	=	2X
AK4-KB1 (3)	2X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
AK4-KB1 (4)	2X	2X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
AK4-KB1 (5)	2X	1024X	=	=	=	=	=	=	=	2X	2X
AK4-MMK (1)	2X	4X	2X	=	=	=	=	=	=	=	=
AK4-MMK (2)	2X	4X	2X	=	=	=	=	=	=	=	2X
AK4-MMK (3)	4X	4X	=	=	2X	=	=	=	=	=	2X
AK4-MMK (4)	4X	4X	2X	=	4X	=	=	=	=	2X	2X
AK4-MMK (5)	2X	2X	2X	=	=	=	=	=	=	2X	=
Kanamicina											
KM4-ANR (1)	2X	2X	128X	256X	=	=	=	=	=	=	=
KM4-MMK (1)	4X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	4X
KM4-MMK (2)	4X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	4X
KM4-MMK (3)	4X	4X	2X	=	=	=	=	=	=	=	2X
KM4-MMK (4)	4X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	2X
KM4-MMK (5)	2X	4X	=	=	=	=	=	=	=	=	2X
KM512-KB1 (1)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (2)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (3)	2X	1024X	2X	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (4)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (5)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (6)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM512-KB1 (7)	2X	512X	=	=	=	=	=	=	=	=	=
KM1024-KB1 (1)	4X	1024X	=	=	=	=	=	=	=	2X	2X
KM1024-KB1 (2)	4X	1024X	=	=	=	=	=	=	=	=	2X
KM1024-KB1 (3)	2X	1024X	2X	=	=	=	=	=	=	2X	2X
Ceftazidima											
CZ1-KB1 (1)	=	=	2X	=	2X	=	=	=	=	2X	=
CZ1-KB1 (2)	=	=	2X	=	2X	=	=	=	=	=	=
CZ1-KB1 (3)	=	=	2X	8X	=	=	=	=	=	=	=
CZ1-KB1 (4)	=	=	2X	=	=	=	=	=	=	2X	=
CZ1-KB1 (5)	=	=	2X	=	=	=	=	=	=	=	=
CZ1-MMK (1)	=	=	2X	=	=	=	=	=	=	2X	=
CZ1-MMK (2)	=	=	2X	=	2X	=	=	=	=	=	=

CZ1-MMK (3)	=	=	4X	=	2X	=	=	=	=	2X	=
CZ1-MMK (4)	=	=	4X	=	=	=	=	=	=	=	=
CZ1-MMK (5)	=	=	2X	=	=	=	=	=	=	2X	=
Norfloxacina											
NF0,12-ANR (1)	=	4X	128X	256X	=	=	=	2X	=	=	=
NF0,12-ANR (2)	=	4X	128X	256X	=	=	=	2X	=	=	=
NF0,12-ANR (3)	=	4X	128X	256X	=	=	=	2X	=	=	=
Triclosan											
TRI0,06-MMK (1)	=	=	=	=	2000X	=	=	=	=	=	=
TRI0,06-MMK (2)	=	=	=	=	2000X	=	=	=	=	=	=
TRI0,06-MMK (3)	=	=	=	=	2000X	=	=	=	=	=	=
TRI0,06-MMK (4)	=	=	=	=	2000X	=	=	=	=	2X	=
TRI0,06-MMK (5)	=	=	=	=	2000X	=	=	=	=	2X	=
Benzalconio											
BZ32-ANR (1)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-ANR (2)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-ANR (3)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-ANR (4)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-ANR (5)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-KB1 (1)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-KB1 (2)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	2X	=
BZ32-KB1 (3)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	2X	=
BZ32-KB1 (4)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-KB1 (5)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-MMK (1)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-MMK (2)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-MMK (3)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-MMK (4)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
BZ32-MMK (5)	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=	=
Hexaclorofeno											
HX64-KB1 (1)	=	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=
HX64-KB1 (2)	=	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=
HX64-KB1 (3)	=	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=
HX64-KB1 (4)	=	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=
HX64-KB1 (5)	=	=	=	=	=	=	4X	=	=	=	=
<i>E.coli</i> EPI300	2	2	0,5	0,03	0,03	32	64	4	<2	0	1

Los clones destacados en color rojo en la Tabla 29, fueron seleccionados a su vez para extraer los fósmidos y comprobar si el fenotipo de resistencia se debía al fragmento clonado procedente de los ambientes extremos analizados o simplemente se debía a una mutación de la cepa de *E. coli* EPI300.

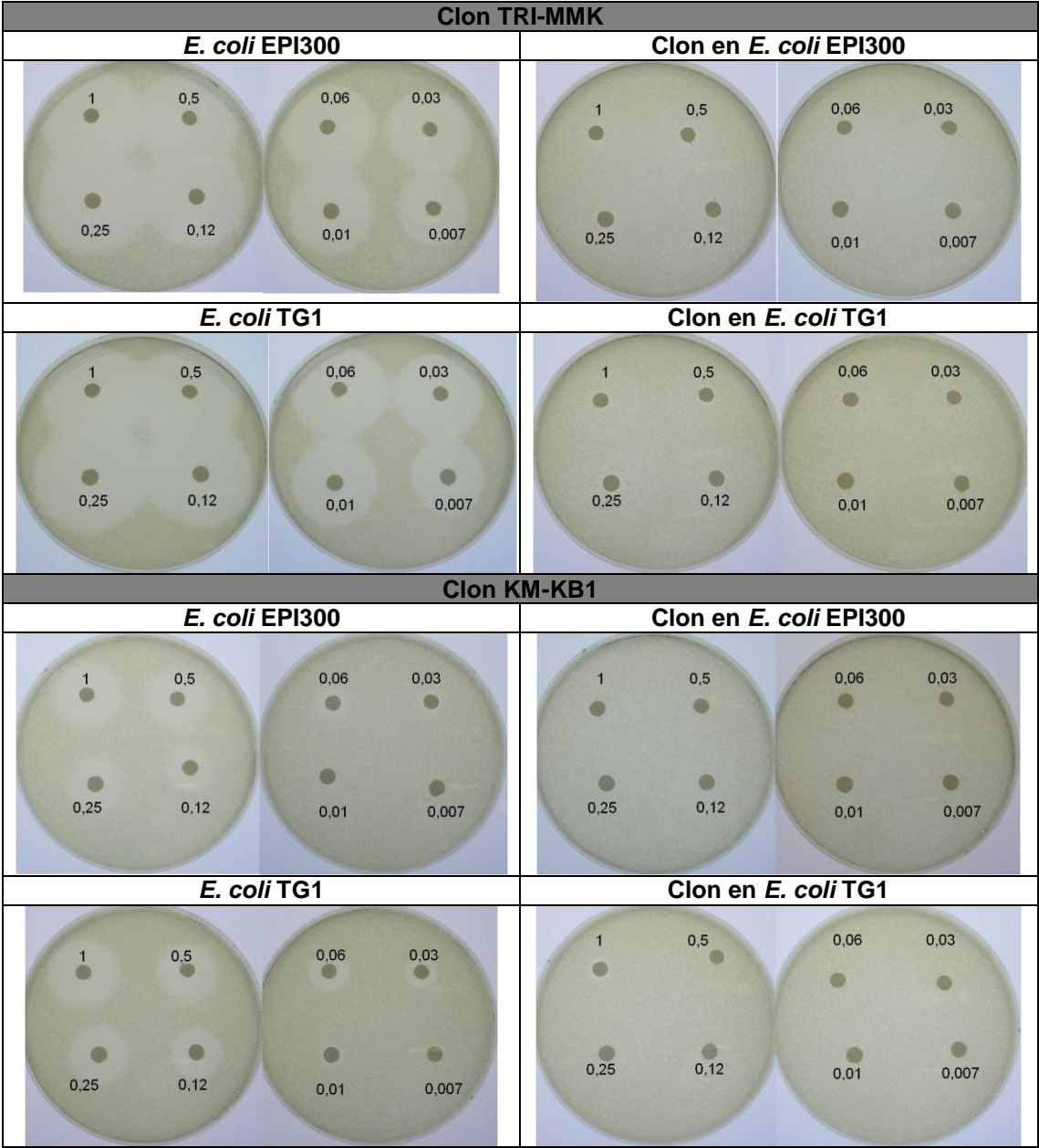
Se escogieron 17 clones, de los 69 clones seleccionados en un principio, con diferentes fenotipos de resistencia a los antibióticos y biocidas probados, y donde se encontraban representadas las 3 genotecas estudiadas.

4.7.3. Comprobación del fenotipo de resistencia

Se extrajeron los fósmidos de los 17 clones elegidos, y se transformó con ellos la cepa de *E. coli* TG1, para comprobar el fenotipo de resistencia observado. Una vez que se comprobó el fenotipo, los fósmidos fueron introducidos nuevamente, en *E. coli* JM109, para demostrar que efectivamente conservaban el fenotipo de resistencia.

De los 17 clones seleccionados, sólo 4 conservaron el fenotipo de resistencia una vez el fósrido era introducido en una nueva cepa, como podemos observar en la Fig. 18. Los clones seleccionados presentan resistencia, en comparación con la cepa *E. coli* EPI300, a triclosan, kanamicina, hexaclorofeno y amikacina, respectivamente.

A los clones que conservaron el fenotipo de resistencia se les determinó, además, la susceptibilidad a otros antibióticos mediante ensayos de difusión en disco para ver si mostraban resistencia cruzada a otros antimicrobianos. Se midieron los halos de inhibición y se compararon con los de la cepa silvestre correspondiente. No se observaron cambios en los diámetros de los halos de inhibición en los clones respecto a su cepa silvestre en los 31 discos de antibióticos probados. Un disco de cloranfenicol fue colocado como control de la presencia del fósrido en cada uno de los clones testados.



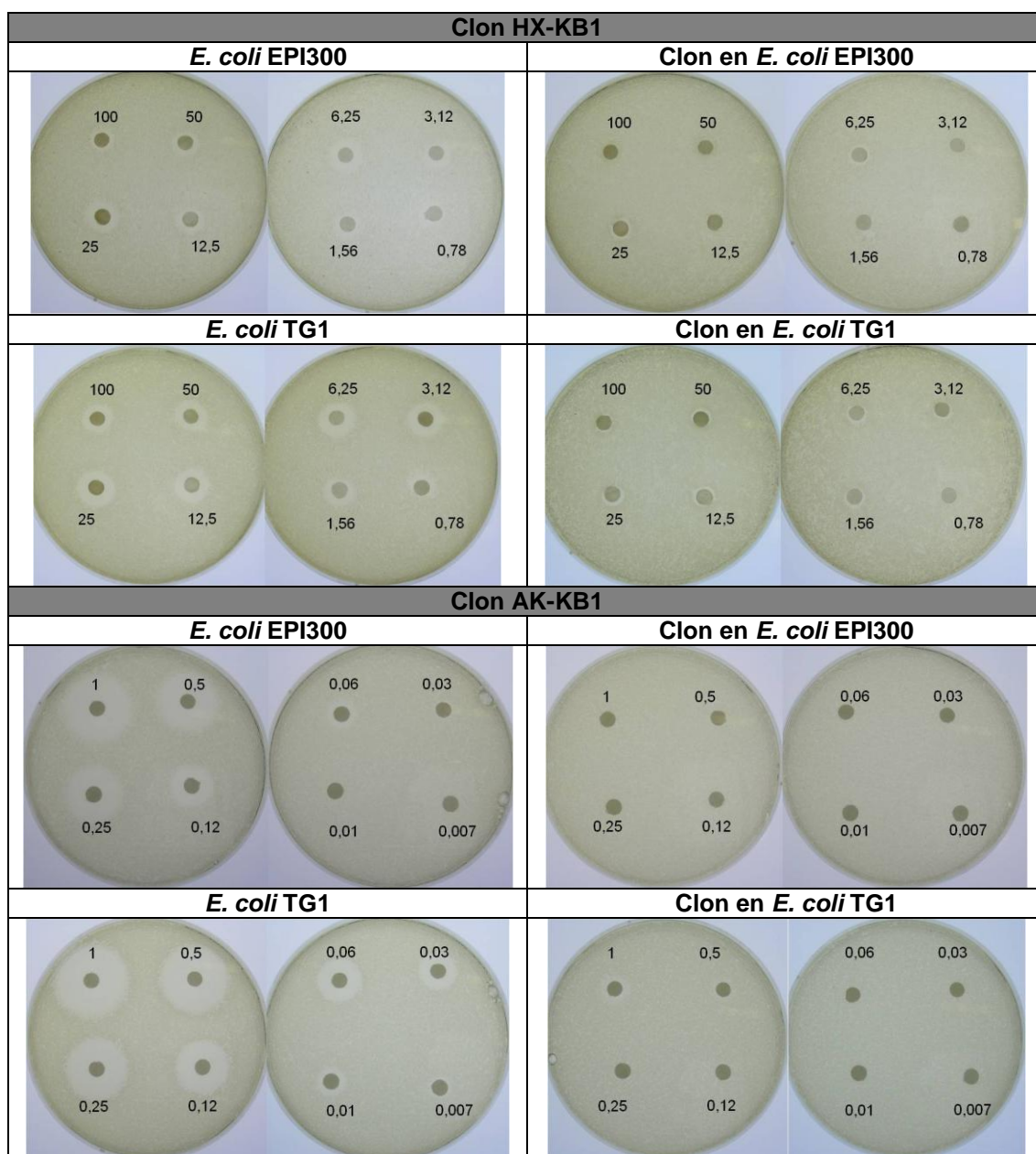


Fig. 18. Clones con el fenotipo de resistencia comprobado.

La figura muestra los clones resistentes a triclosan (TRI-MMK), kanamicina (KM-KB1), hexaclorofeno (HX-KB1) y amikacina (AK-KB1). Los halos de inhibición en los clones resistentes son en, todos los casos, de menor tamaño en comparación con la cepa silvestre.

Finalmente, los fósmidos pertenecientes a los clones con el fenotipo de resistencia verificados fueron enviados a secuenciar. En la Fig. 19 podemos observar los 4 fósmidos luego de una electroforesis a 4 °C, O/N, en gel de agarosa 1 % en TAE.

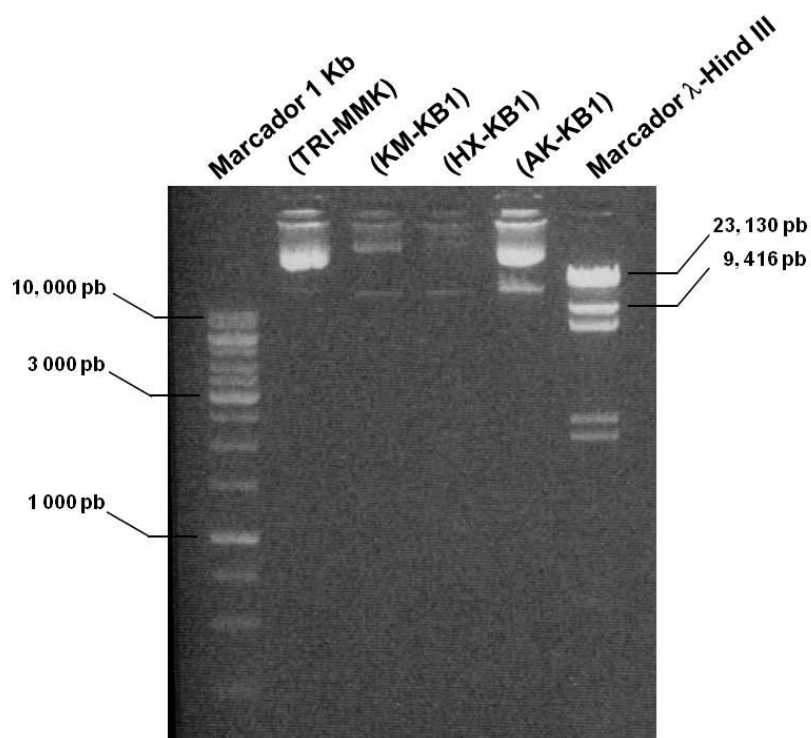


Fig. 19. Electroforesis para los fósidos con fenotipo de resistencia.

Los tamaños aproximados de los fósidos se corresponden con los esperados según los datos obtenidos de la construcción de las genotecas.

Las concentraciones finales para la secuenciación de los fósidos fue de 323 ng/μL para el clon TRI-MMK, 250 ng/μL para KM-KB1 y HX-KB1 y 481 ng/μL para AK-KB1. La relación 260/280 fue mayor de 1,8 para todos los fósidos. Se enviaron más de 5 μg totales necesarios para la secuenciación de cada uno de los fósidos obtenidos.

4.7.4. Secuenciación de los fósmidos

A continuación, en la Fig. 22, Fig. 21 y Fig. 22, se muestran los genes presentes en cada fósrido secuenciado: resistente a triclosan, resistente a hexaclorofeno y resistente a amikacina, respectivamente. La secuencia obtenida para los fósridos resistentes a kanamicina y amikacina fue la misma por lo que sólo se muestra la estructura de uno de ellos.

Fósrido resistente a triclosan (30,932 Kb)

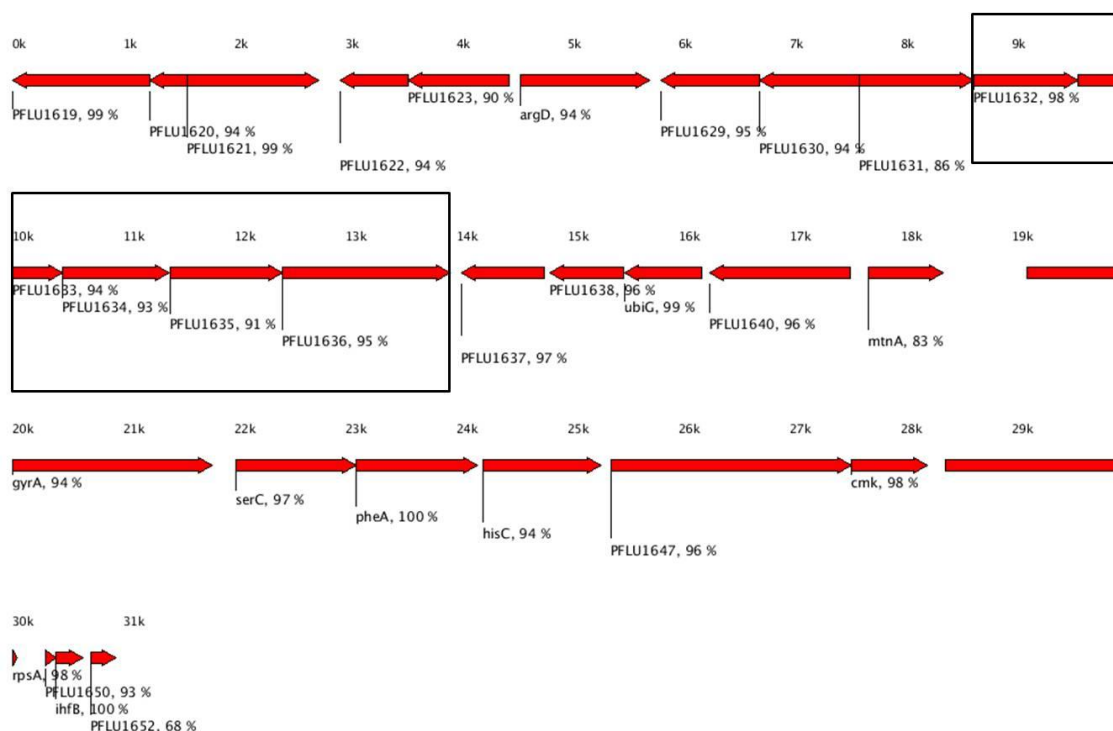


Fig. 20. Genes presentes en el fósrido resistente a triclosan.

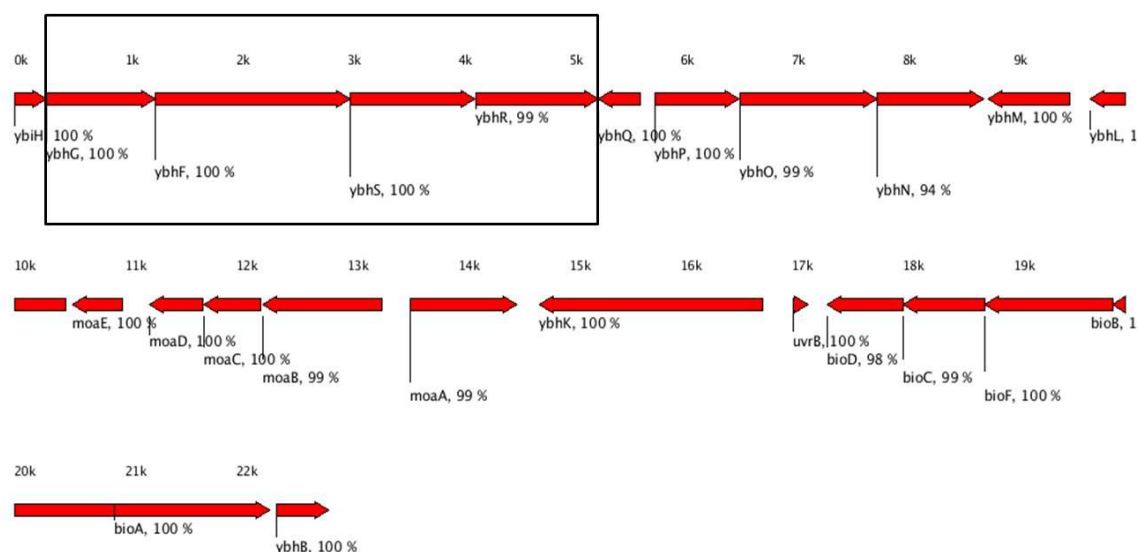
Los genes encontrados en el fósrido resistente a triclosan pertenecen a *Pseudomonas fluorescens* y tienen la misma sintenia encontrada en el cromosoma de ésta. La descripción detallada de los genes se encuentra en la Tabla 31 del Anexo I. En los cuadros se encuentran los genes que codifican el transportador tipo ABC.

El fósforo resistente a triclosan procede de la genoteca de Múrmansk. La mayoría de las proteínas con homologías encontradas en este fósforo pertenecen a *Pseudomonas fluorescens* y presentan la misma distribución de genes que en este microorganismo. Está publicada la secuenciación de este microorganismo con las funciones de los genes establecidas mediante predicción pero sin la evidencia experimental de las mismas (Silby *et al.* 2009). No sabemos por tanto, si el transportador tipo ABC encontrado, codificado por los genes *PFLU1632*, *PFLU1633*, *PFLU1634*, *PFLU1635*, *PFLU1636*, pudiera estar involucrado en la resistencia a triclosan. Del mismo modo, tampoco conocemos si otras proteínas halladas pudieran modificar el triclosan y ser la causa del fenotipo de resistencia observado para este biocida. Sí se sabe por artículos publicados, que el transportador ABC está relacionado con la resistencia intrínseca bacteriana. Se ha visto que el transportador ABC, confiere resistencia a determinados antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos como bacitracina, nisina, plectasina, entre otros (Collins *et al.* 2010). Este transportador pudiera ser la causa de la resistencia a triclosan observada en las cepas transformadas con este fósforo. La descripción de los genes del fósforo resistente a triclosan se encuentran en la Tabla 31, en el Anexo I.

En el fósforo resistente a hexaclorofeno, aislado de la fosa hipersalina MEDEE, encontramos que la mayoría de las proteínas tienen homología con *Escherichia coli*. En este caso, hallamos el gen *ybhG* que codifica una proteína de fusión de membrana, componente de bomba de expulsión, localizado al lado de los genes *ybhF*, *ybhS*, *ybhR* que codifican proteínas de un transportador tipo ABC. Al igual que en el fósforo resistente a triclosan, el transportador tipo ABC, pudiera estar implicado del mismo modo, en la resistencia observada para hexaclorofeno. En la Tabla 32, Anexo I, se encuentran el resto de los genes hipotéticos localizados en este fósforo.

La bomba de expulsión tipo ABC es dependiente de la hidrólisis de ATP, energía necesaria para su funcionamiento. En ambos fósforos, resistente a triclosan y hexaclorofeno, encontramos las proteínas que se encargarían de realizar dicha función junto con el resto de componentes que formarían la bomba de expulsión. Las bombas de expulsión múltiple de drogas (MDR), que incluye las familias ABC, RND, MFS, MATE y SMR, están involucradas en ambientes no clínicos, en la resistencia a metales pesados (Silver and Phung 1996) y solventes orgánicos (Ramos *et al.* 2002).

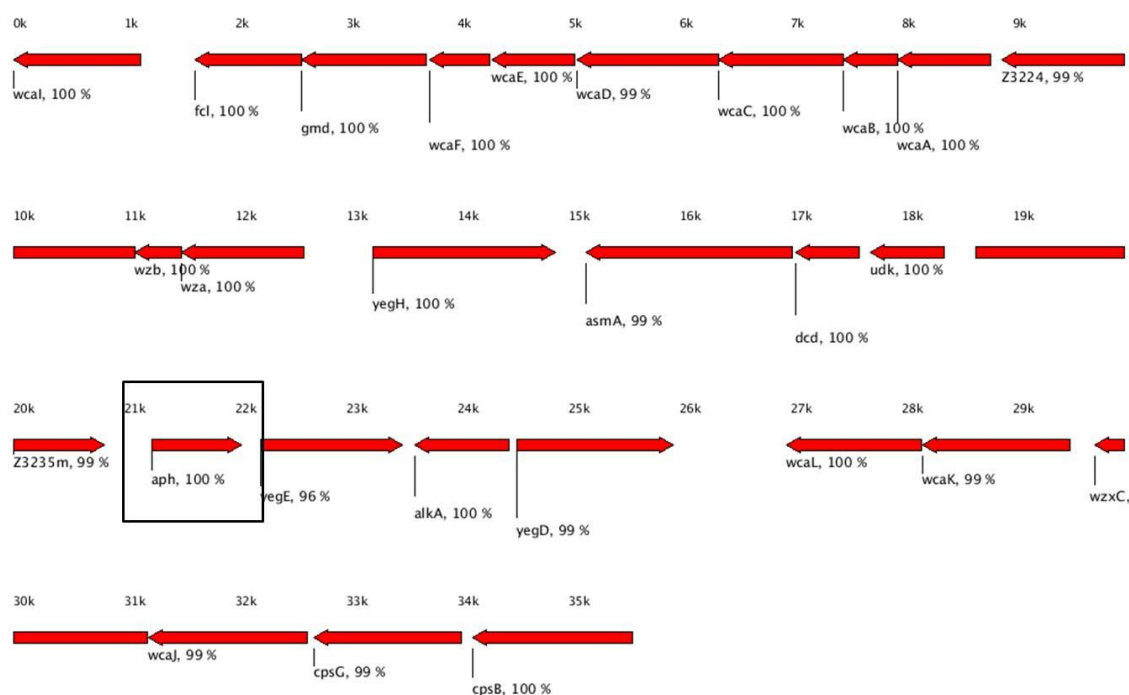
Fósmido resistente a hexaclorofeno (22,834 Kb)

**Fig. 21. Genes presentes en el fósido resistente a hexaclorofeno.**

Los genes hallados en el fósido resistente a hexaclorofeno pertenecen a *Escherichia coli* y presentan la misma sintenia encontrada en el cromosoma de esta bacteria. La nomenclatura de cada uno de ellos se encuentra en la Tabla 32 del Anexo I. Destacado en un cuadro se localizan los genes que codifican el transportador tipo ABC

En el fósido resistente a amikacina–kanamicina procede, al igual que el fósido resistente a hexaclorofeno, de la fosa hipersalina MEDEE. En este fósido encontramos el gen *aph* que codifica una aminoglucósido 3` - fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina. Este gen sería la causa, seguramente, de la resistencia observada a este antibiótico. La descripción del resto de los genes hallados en este fósido se encuentra en la Tabla 33, Anexo I.

Fósmido resistente a amikacina (35,574 Kb)

**Fig. 22. Genes presentes en el fósido resistente a amikacina.**

Los genes hipotéticos se obtuvieron por comparación de secuencias. En este fósido la resistencia observada a amikacina y kanamicina estaría dada probablemente por el gen *aph* de resistencia a aminoglucósidos. Todos los genes encontrados en el fósido de resistencia a amikacina siguen la misma estructura que en *Escherichia coli*, menos el gen *aph*, que es consecuencia de una inserción dentro de esta organización. La descripción de cada uno de los genes se encuentra en la Tabla 33, Anexo I. En un cuadro de color negro se señala la localización del gen *aph*.

DISCUSIÓN

5. Discusión

La emergencia y diseminación de genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias patógenas sigue siendo el mayor problema en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el ámbito clínico. Sin embargo, como hemos dicho en apartados anteriores, son pocos los estudios que abordan la presencia y distribución en los reservorios naturales (ambientes no clínicos) de estos genes de resistencia. Los integrones, como elementos de captura de genes, desempeñan un papel importante en la propagación de cassettes genéticos entre diferentes microorganismos, no solo de resistencia a los antibióticos sino de otros genes importantes en la adaptación de las bacterias a los cambios en el medioambiente. La variación de factores ambientales pueden provocar cambios en la biosfera, incluyendo la microbiota, y modificar, ejerciendo presión selectiva, la presencia y actividad de elementos genéticos involucrados en la transferencia horizontal de genes. Es por eso que nos propusimos estudiar la presencia y distribución de elementos de captura de genes, como son los integrones, en diferentes ambientes, así como investigar en los posibles cassettes genéticos que pudieran transportar en su estructura.

5.1. Integrasas y regiones centrales en ambientes contaminados y no contaminados

Los microorganismos del suelo tienen una gran importancia en el mantenimiento de la vida en nuestro planeta. El estudio, usando técnicas metagenómicas, de elementos genéticos que puedan contribuir a entender la adaptabilidad de las bacterias frente a las variaciones ambientales en diferentes ecosistemas, así como la evolución de éstos a través de los años, constituye por tanto un tema de interés. En esta memoria, tratamos de aportar nuevos datos que permitan conocer aún más, el papel que desempeñan los integrones y cassettes génicos en diferentes ambientes.

Las integrasas y regiones centrales halladas tanto en los ambientes contaminados como en los ambientes no contaminados estudiados, demuestra que los integrones se encuentran ampliamente distribuidos en los medioambientes naturales (no clínicos). La gran variedad de regiones centrales, nos hace pensar también en las posibles combinaciones que pudiera presentar la estructura de estos elementos de captura génica en los ecosistemas naturales, así como en la diseminación, mediante transferencia horizontal de genes, de una gran cantidad de potenciales cassettes génicos.

Diferentes estudios indican, del mismo modo que nuestros resultados, la existencia de una gran cantidad de cassettes e integrones en ambientes naturales. Stokes y colaboradores encontraron cassettes con homología con transferasas, glicosilasas así como secuencias sin homólogos conocidos en las bases de datos, en muestras colectadas del suelo y agua con diferentes localizaciones en Australia y en la Antártida (Stokes *et al.* 2001). Más recientemente, se han hallado cassettes involucrados en el metabolismo de azúcares, en la síntesis de la pared celular, motilidad, regulación, etc., en aguas residuales de Portugal (Moura *et al.* 2010). Al igual que en nuestros resultados, la mayoría de los cassettes hallados en las muestras ambientales, corresponden a proteínas no implicadas directamente en resistencia a los antibióticos. Los integrones están involucrados en la adaptación de las bacterias a los cambios que se producen en el ambiente, a un nivel mucho más amplio, que incluye por supuesto, la resistencia a los antibióticos. Para ello, posee la capacidad de captar una gran variedad de cassettes, cada uno de los cuales podría estar seleccionado para su mantenimiento en el ecosistema por diferentes factores ambientales.

Las integrón integrasas obtenidas en los ambientes contaminados y no contaminados analizados, constituyen secuencias nuevas con porcentajes de identidad mayores del 60 % con integrasas previamente descritas en su mayoría pertenecientes a bacterias no cultivadas. Nemergut y colaboradores, buscando integrones en un ambiente contaminado por metales, secuenciaron 96 clones de los cuales sólo 46 fueron integrasas y de ellas únicamente 15 fueron diferentes entre sí (Nemergut *et al.* 2004). Resultados semejantes obtuvimos nosotros al examinar tanto las muestras contaminadas, como no contaminadas y la fosa marina Urania. Del mismo modo, ellos hallan una gran diversidad en base a la secuencia de proteínas de las integrasas en comparación con *intl1* y secuencian integrasas tipo 1 pero en menor cantidad comparado con el número de integrón integrasas nuevas halladas. Nuestros resultados siguen esta misma tendencia. Nosotros encontramos una gran cantidad de integrón integrasas, todas ellas secuencias nuevas, y solamente hallamos 3 integrasas tipo 1 en las muestras de los ambientes contaminados, no contaminados y la fosa marina Urania analizadas. Si tenemos en cuenta que la mayoría de las bacterias que viven en el ambiente no han podido ser estudiadas debido a que no han sido cultivadas en condiciones de laboratorio y que los integrones se han buscado poco en ambientes naturales, quizás no debiera sorprendernos el hecho de encontrar en estos ambientes, proteínas nuevas o sin homología formando parte de estructuras conocidas por su impacto en el ambiente clínico y no por su función en la naturaleza.

La acumulación de genes de resistencia en los integrones y por tanto, en las bacterias, contribuye a entender la constante aparición de cepas de patógenos bacterianos multirresistentes a una amplia variedad de antibióticos (Levesque *et al.* 1995). En cepas clínicas de las familias de las *Enterobacterias*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* se ha demostrado la presencia de integrones con diferentes combinaciones en el orden de los cassettes encontrados. La mayoría de ellos correspondían a numerosos tipos de transferasas (Levesque *et al.* 1995; Jacobs and Chenia 2007). Este tipo de cassette se repite mucho en la estructura de los integrones. Muchos de los cassettes encontrados en las muestras ambientales analizadas así como en la búsqueda realizada en genomas y metagenomas, hallábamos este tipo de cassettes como *aadA* (nucleotidiltransferasa), *aac* (acetiltransferasa), *ant* (adeniltransferasa) o *aph* (fosfotransferasa). Todos ellos confieren resistencia a los aminoglucósidos.

En aislamientos en *Aeromonas sp.* y *Enterobacteriaceae* procedentes de plantas de tratamiento de aguas se encontraron integrones tipo 1 asociados a genes de resistencia como *aadA* así como integrones vacíos (Moura 2007), correspondiéndose con nuestros resultados, pero con la diferencia de que muchos de estos estudios aíslan inicialmente las bacterias y nosotros analizamos directamente una mezcla compleja de DNA donde la mayoría de los microorganismos no son cultivables en condiciones de laboratorio. Nuestros resultados tratan de estudiar en profundidad la presencia de integrones en diferentes ambientes sin un cultivo previo, lo que nos da una visión más amplia en cuanto a la diversidad y variabilidad de los integrones en los metagenomas analizados.

Otro cassette encontrado en nuestras muestras tanto contaminadas como no contaminadas, es el cassette *aac(6')-Ib-cr* que confiere resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Este cassette también ha sido hallado en aislados clínicos de cepas de *Enterobacteriaceae*, formando parte de la región variable de integrones tipo 1 junto con otros cassettes como *aadA*, *qnr* (de resistencia a quinolonas) y *cat* (resistencia a cloranfenicol) (Quiroga *et al.* 2007). Encontrar el cassette *aac(6')-Ib-cr* en los suelos contaminados y no contaminados analizados, es consecuencia, probablemente, del aumento del uso de las fluoroquinolonas como ciprofloxacina o norfloxacina en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Por otra parte, los genes de resistencia a los antibióticos confieren, cada vez con más frecuencia, resistencia a múltiples antibióticos como es el caso del cassette *aac(6')-Ib-cr*. Es necesario por tanto, seguir controlando el uso de los antimicrobianos como

medida primaria para el control en la aparición de nuevas bacterias multirresistentes.

La importancia que tiene la resistencia a los antibióticos en la clínica ha llevado a una mayor búsqueda de integrones en este ambiente que en otros. Por esta razón, los cassettes de genes presentes en los integrones conocidos hasta el momento, son mayoritariamente genes de resistencia a antibióticos. Se ha comprobado que existen integrones con más de una copia de genes de resistencia, por lo que éstas bacterias serán mucho más resistentes en comparación con aquellas que posean solamente una copia del gen (Collis and Hall 1992b). La carencia de nuevos antibióticos y los problemas de aumento de resistencias, pueden hacer necesario pensar en inhibidores de la integrasa como medida de control.

Los cassettes de genes presentes en los integrones pueden provenir tanto de otros integrones como de DNAs capaces de realizar el tipo de recombinación requerido. En cualquier caso, si la expresión del nuevo gen supone un beneficio para la bacteria, ésta dispondrá de una ventaja selectiva que le permitirá desplazar a las demás (Hall *et al.* 1991; Recchia *et al.* 1994). Este desplazamiento ocurre tanto en ambientes clínicos como no clínicos, por lo que no existiría una restricción en las funciones de los cassettes, aunque en los ambientes clínicos claramente predominen determinantes de resistencia. En *Vibrio cholerae* se ha visto un gran número de cassettes que codifican proteínas sin homólogos y función conocidas, o proteínas con homólogos conocidos pero con función desconocida (hipotéticas) (Boucher *et al.* 2007). Entre los cassettes que encontraron, hallaron cassettes con funciones involucrados en virulencia, modificación de DNA, transferasas, etc. En nuestro trabajo también localizamos muchos cassettes en los que no detectamos homología con secuencias depositadas en las bases de datos, cuando analizamos las muestras ambientales contaminadas, no contaminadas y alejadas de la actividad humana (Urania). Estas secuencias podrían constituir potencialmente cassettes no descritos, con zonas de recombinación diferentes a las conocidas hasta el momento. Los sitios de recombinación son regiones variables, que conservan solamente sus extremos y por tanto, podrían constituir secuencias aún sin anotar en las bases de datos consultadas.

En un estudio en tres muestras marinas encontraron que la mayoría de los cassettes constituían, del mismo modo, proteínas nuevas. Las proteínas conocidas estaban relacionadas con funciones de adaptación de las bacterias: regulación, síntesis, energía y metabolismo, transporte, entre otras (Koenig *et*

al. 2008). Muchos de los cassettes encontrados en nuestras muestras analizadas, constituyen proteínas nuevas, sin homología, desconocidas hasta el momento. Además se encontraron cassettes con proteínas hipotéticas o involucradas en otras funciones celulares no ligadas a la clásica función de resistencia a los antibióticos atribuida a los integrones. Las proteínas hipotéticas encontradas, asociadas a la estructura de los integrones, están seleccionadas para formar parte de éste, por lo que podrían tener una función importante en la adaptación de las bacterias. Como hemos dicho a lo largo de esta tesis, parece ser que los integrones desempeñan una función mucho más amplia que la de resistencia a los antibióticos, atribuida en el ambiente clínico, contribuyendo sustancialmente a la fisiología y la adaptación de las bacterias para enfrentar diferentes cambios y sobrevivir.

Se podría decir que el conjunto de cassettes en el ambiente a los que los integrones pudieran tener acceso es bastante grande y diverso (Michael *et al.* 2004). Por otra parte, la capacidad de los cassettes de genes de los integrones para escindirse y formar círculos autónomos aptos para integrarse en un integrón diferente, hacen de éste un elemento dinámico. Sin embargo, no sabemos si los integrones pueden interaccionar con todo el conjunto de cassettes presentes en un determinado ambiente o si sólo una parte de éste conjunto estaría disponible para ser captado por un integrón. Desconocemos también la velocidad en la adquisición o pérdida de un cassette o cuál es el rango de variación de los sitios *attC* para seguir recombinando, entre otras muchas cuestiones.

Todas las propiedades mencionadas hasta el momento, junto con el gran número de posibilidades de recombinación e intercambio que poseen los integrones y los cassettes de genes, proporciona a las bacterias que los incluyan en su estructura una gran versatilidad y, por tanto, la posibilidad de una rápida adaptación para hacer frente a los diferentes estreses ambientales.

En nuestro trabajo no pudimos establecer un efecto de la contaminación en la presencia de integrones y cassettes génicos. Sin embargo, en experimentos usando microcosmos de suelo contaminados con residuos de sulfadiazina, se ha visto un incremento en los *hot spots* o puntos calientes para la transferencia horizontal de genes (Brandt *et al.* 2009). El aumento de los puntos calientes en el suelo, podría favorecer la diseminación de reservorios de genes y como consecuencia de los cassettes génicos que contengan, incluyendo los genes de resistencia a los antibióticos. En un estudio reciente tampoco encuentran un efecto de la contaminación sobre el conjunto de

cassettes génicos disponibles en el ambiente, no así en el número de *intl1*, donde sí hallan un aumento de éstas en los ambientes contaminados (Wright *et al.* 2008). En general, podemos decir que no está todavía clara la influencia de la contaminación en los elementos de captura de genes y de movilidad génica, aunque sí parece ser que en los ambientes contaminados está favorecida la transferencia horizontal de genes.

5.2. Integrasas y regiones centrales en un ambiente aislado de la actividad humana, la fosa Urania

Urania es una de las fosas marinas hipersalinas que junto a L'Atalante, Discovery y MEDEE se encuentran situadas en el Mar Mediterráneo. Está ubicada a más de 3000 metros de profundidad y sometida a factores ambientales como: altas presiones, concentración salina y de azufre, ausencia de oxígeno y luz, que hacen que sea considerada como un ambiente extremo, único y poco explorado (Ferrer *et al.* 2005). Su origen se remonta de 5 a 8 millones de años y su formación fue debido a la disolución de rocas salinas denominadas "evaporitos". La alta salinidad y el gradiente de temperatura existente en este ambiente así como la diferencia de densidades entre las distintas capas estratificadas, sugieren que las aguas de éstas fosas marinas no se hayan mezclado con el resto del Mediterráneo (Sass *et al.* 2001).

Actualmente se han publicado pocos estudios acerca de estas fosas del Mediterráneo. Por el momento, la mayoría de los artículos sobre estas fosas marinas tratan de encontrar o nuevas enzimas o funciones o caracterizar la comunidad microbiana presente (Ferrer *et al.* 2005; van der Wielen and Heijs 2007; Yakimov *et al.* 2007; Sass *et al.* 2008; Alexander *et al.* 2009). Por ejemplo, recientemente, se hallaron 5 enzimas nuevas con actividades útiles para la síntesis de nuevos fármacos (Ferrer *et al.* 2005). La poca información sobre elementos de captura génica en aguas profundas nos llevó a analizar la presencia de integrones en esta muestra tan peculiar, aislada de la actividad humana y, por tanto, de la presión que ejercen los antibióticos utilizados en la clínica o en prácticas agrícolas.

Las integrasas encontradas en Urania son todas secuencias nuevas con dominios comunes con integrasas descritas previamente, en su mayoría correspondientes a bacterias que no han sido cultivadas. Todas ellas comparten una identidad superior al 50 %. Existe poca información acerca de la presencia de elementos genéticos en aguas profundas. En un estudio reciente,

se encontraron una gran cantidad de integrasas y cassettes con una alta similitud con transferasas y proteínas en general, lo que ratifica el hecho de que el sistema integrón/cassette génico está presente en este tipo de ambientes (Elsaied *et al.* 2007). La cantidad de integrasas y cassettes hallados fue similar a los que nosotros hemos encontrado en este estudio así como el tipo de cassettes: transportadores, transferasas y por supuesto, cassettes sin homología descrita en las bases de datos. También identificaron diferentes sitios *attC*, lo que coincide con los resultados mostrados en esta tesis. Algunos cassettes encontrados en *Urania* como proteínas transportadoras, pertenecientes a la familia de las porinas, reductasas, proteínas hipotéticas, entre otras, no estaban flanqueados por las regiones conservadas típicas de los integrones aunque sí presentan repeticiones habituales en las secuencias *att*. En uno de los cassettes obtenidos en los que no se identificaron ni la región conservada 5' ni 3', se planteaba, por la comparación con las bases de datos, que se trataba de un posible cassette asociado a un integrón. También encontrábamos el caso contrario, donde sí reconocíamos la región conservada pero no el tipo de cassette por no tener homología. Estos ejemplos confirmarían la presencia no sólo de cassettes diferentes en los medioambientes naturales, sino también de posibles zonas *att* nuevas y diferentes entre sí, aún sin anotar en las bases de datos.

En la muestra *Urania* identificamos el cassette de resistencia a estreptomycin y espectinomycin, *aadA*, que podría estar asociado a las integrasas descubiertas como parte de la estructura del integrón. Este tipo de cassette lo hallamos también en las muestras contaminadas y no contaminadas, y constituye el cassette más frecuentemente encontrado en los integrones clase 1, ampliamente difundido entre los patógenos bacterianos (Levesque *et al.* 1995). El hecho de encontrar este cassette de resistencia a antibióticos en un ambiente aislado tiene una gran relevancia porque este ambiente no ha estado expuesto a la presión por los antibióticos. No obstante, sería necesario comprobar que en realidad este cassette se encuentra en aguas profundas y no proviene de algún tipo de contaminación durante la manipulación de la muestra.

Para comprobar de cierto modo la presencia del gen *aadA* en este ecosistema, se buscó este gen en otros ecosistemas naturales, en las bases de datos de metagenomas y en bacterias no cultivadas. El gen *aadA* fue localizado en diferentes metagenomas, en los que también habíamos hallado genes pertenecientes a la estructura de los integrones tipo 1. Todos los metagenomas en los que encontramos el gen *aadA*, son ecosistemas

contaminados por la mano del hombre en los que posiblemente se hallen bacterias patógenas y por tanto, la presencia de integrones tipo 1 y del gen *aadA* sea consecuencia de este hecho. A pesar de que se utilizaron los métodos necesarios para impedir la contaminación de la muestra Urania por DNA exógeno y el experimento se repitió varias veces dando resultados semejantes, no podemos en este momento descartar una posible contaminación por un DNA que contuviera el gen *aadA*. Sin embargo, el hecho de que se hayan encontrado bacterias resistentes a los antibióticos en bacterias provenientes de aves que viven en el Ártico, donde no existe presión selectiva de los antibióticos (Sjolund *et al.* 2008) y la extraordinaria diseminación de estos elementos no nos permite descartar la posibilidad de que *aadA* se encuentre efectivamente en el DNA proveniente de Urania al igual que en el resto de los metagenomas y bacterias no cultivadas en los que se encontró.

En Urania encontramos una gran diversidad de integrasas y regiones centrales, muchas secuencias sin homólogos conocidos, cassettes no anotados y proteínas hipotéticas. Esto nos pudiera sugerir que hay mucho por descubrir todavía en esta muestra donde parece ser que existe una gran riqueza génica y un alto grado de inespecificidad en las regiones flanqueantes de sus cassettes génicos.

En ambientes naturales (no clínicos) como los analizados en este estudio (Urania, muestras contaminadas y no contaminadas) encontramos una mayor diversidad de cassettes así como de sus zonas de recombinación *att*. Esto permitiría una rápida diseminación de los cassettes entre los microorganismos como respuesta a un cambio en las condiciones del medioambiente, favoreciendo por tanto, la adaptación de las bacterias.

5.3. Análisis del ambiente clínico, muestras procedentes del intestino humano

En las muestras clínicas procedentes de intestino humano tanto de pacientes sanos como enfermos, encontramos solamente la integrasa tipo 1. Podría ser que la integrasa *intl1*, presente en ecosistemas naturales (no clínicos) fuera la primera en asociarse con determinantes de resistencia (efecto fundador) y con elementos móviles exitosos, que favorecieran su diseminación y le permitiera no sólo permanecer a lo largo de los años, sino ser también la más representativa en el ámbito clínico. La presencia del gen *qac*, de

resistencia a compuestos cuaternarios de amonio como los antisépticos y desinfectantes empleados diariamente en la práctica clínica, explica que encontremos integrones tipo 1 en las bacterias patógenas y en aquellos ambientes que han sido contaminados por la mano del hombre.

Los integrones tipo 1 se han localizado en cepas de la familia *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL), en un estudio donde analizaban muestras comprendidas entre los años 1988 y 2003 (Machado *et al.* 2007). La organización observada en muchos de los integrones encontrados así como en los plásmidos donde estaban anclados era la misma, lo que nos sugiere que los integrones son estructuras que se conservan en el tiempo. Todos los aislamientos pertenecientes a *Enterobacteriaceae* diferentes de *E. coli*, presentaron únicamente integrones tipo 1, mientras que *E. coli* presentaba integrones tipo 1 y tipo 2.

En tres de los voluntarios sanos se obtuvieron tanto la integrasa tipo 1, *intI1*, como la integrasa tipo 2, *intI2*. Se ha visto que microorganismos con integrones tipo 2, comúnmente presentan también integrones tipo 1 (Hansson *et al.* 2002). La integrasa tipo 1 sería la encargada de la integración/escisión de los cassettes en los casos en que la integrasa tipo 2 no sea funcional.

En un análisis comparativo con heces de pacientes y agua potable en Jordania, se observó la presencia de plásmidos con integrones tipo 1 en aislamientos de *E. coli* tanto en uno como en otro ambiente, muchos de ellos con resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico y sulfonamidas (Shehabi *et al.* 2006). Estos resultados indican que estos ambientes constituyen un potencial reservorio de integrones con genes de resistencia a los antibióticos así como el hecho de que los integrones tipo 1 están ampliamente diseminados en la naturaleza.

Aún desconocemos el tamaño actual del conjunto de cassettes, incluyendo los genes de resistencia a los antibióticos, que podemos encontrar en el ambiente o cuán rápido éstos pueden moverse entre diferentes microorganismos y ecosistemas. Esto limita grandemente el control de la resistencia bacteriana en los ambientes comunitario e intrahospitalario. Lo que sí queda claro, es que la rápida emergencia de integrones con genes de resistencia a múltiples antibióticos asociados a plásmidos o transposones, es reflejo de la eficiencia de estos elementos como sistema de captura de genes.

5.4. Cuantificación de las integrasas en diferentes ambientes

Uno de los aspectos necesarios para comprender a fondo la transferencia horizontal de genes es estimar la cantidad de elementos que contribuyen a dicha transferencia como integrasas, cassettes génicos, plásmidos, etc., en diferentes ambientes y bajo diversos factores que pudieran incrementar o disminuir la HGT. Varios estudios han buscado elementos genéticos móviles (Smalla and Sobecky 2002; van Elsas and Bailey 2002; Frost *et al.* 2005) pero no de una forma cuantitativa. En un estudio en granjas buscando genes de resistencia a los antibióticos e integrones, usando métodos dependientes e independientes del cultivo, encontraron un incremento de éstos en bacterias Gram positivas en comparación con bacterias Gram negativas (Nandi *et al.* 2004), donde inicialmente fueron descubiertos los integrones. También hay un estudio en el que demuestran un aumento en la abundancia del plásmido IncP-1 y de genes de resistencia a mercurio en sedimentos contaminados con mercurio (Smalla *et al.* 2006). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de cómo se afecta la presencia de elementos genéticos bajo diferentes condiciones ambientales.

Analizando la presencia de integrasas en ambientes contaminados y no contaminados, nuestros resultados sugieren que existe una diferencia en la presencia de genes *intl1* entre uno y otro ambiente. Sin embargo, observamos una variabilidad entre las diferentes muestras. Algunos autores han encontrado diferencias en la presencia de integrasas en diferentes ambientes. En un estudio con muestras contaminadas con una mezcla de metales procedentes de la industria, los autores encuentran una mayor presencia de *intl1* en las muestras contaminadas pero no hallan diferencias respecto a un enriquecimiento de los cassettes (Wright *et al.* 2008). En otras publicaciones basadas en técnicas dependientes de un cultivo previo, obtuvieron que entre un 1 % y un 10 % de las bacterias medioambientales contenían *intl1* (Nandi *et al.* 2004; Boucher *et al.* 2007). Sin embargo, en otros artículos encuentran *intl1* en el 50 % de los aislamientos con múltiples genes de resistencia a drogas (Biyela *et al.* 2004). Las diferencias entre unos y otros estudios se debe a que existen muchos factores que pueden influir no sólo en la metodología a nivel de laboratorio sino también en las características propias de cada muestra a analizar. El efecto de diferentes factores ambientales sobre la transferencia horizontal de genes, la microbiota y el mantenimiento de ciertos elementos bajo presión selectiva, dificulta la cuantificación de los elementos genéticos involucrados en la movilidad genética. La influencia de la contaminación en los

elementos de movilidad es una de las cuestiones actualmente más difíciles de analizar pero que no debe dejar de ser investigada, sistemáticamente.

La contaminación junto con otros factores ambientales, pueden influir en la microbiota, pero podría ser que estos cambios medioambientales no afecten directamente el número de elementos de captura de genes. La transferencia horizontal de genes podría no depender de la cantidad de estos elementos génicos sino de los recursos existentes en cada tipo de ambiente. Un cambio en determinadas condiciones ambientales podría favorecer la transferencia de genes, y por tanto la actividad del conjunto de elementos móviles presentes en ese ecosistema.

En general, la presencia de integrones en ambientes naturales y clínicos es consecuencia del integrón en sí (habilidad para adquirir e insertar nuevos genes), de la capacidad adaptativa de los cassettes dentro de los integrones (selección directa) o de otros elementos genéticos a los que los integrones pueden estar ligados (selección indirecta) (Wright *et al.* 2008).

5.5. Integrones en bases de datos de genomas y metagenomas

Actualmente la bioinformática es una de las herramientas más poderosas para la búsqueda de genes, funciones, e información en general en las bases de datos de secuencias. La aparición constante de nuevas secuencias y bases de datos, constituye una gran ventaja en el análisis de un gran cúmulo de información imposible de imaginar unos años atrás.

La búsqueda de integrones en bases de genomas completos y parciales, nos permitió analizar 1014 genomas y poder trazar la estructura y el entorno genético de los integrones en diferentes microorganismos. En el caso de los metagenomas, pudimos estudiar 1486 aunque algunos de ellos estaba repetido en diferentes bases de datos, encontrando integrasas tipo 1 y numerosas integrón integrasas en una gran variedad de ambientes.

El gen *qac* ha sido encontrado en muestras ambientales, asociados a integrones tipo 1 idénticos a los hallados en el ambiente clínico, a secuencias de integrón integrasas conocidas solamente en ambientes naturales y a otras clases de integrones (Gillings *et al.* 2009a; Gillings *et al.* 2009b). Esto nos demuestra que el gen *qac* es usualmente hallado en muestras ambientales, como hemos visto también nosotros, y que pudiera estar formando parte de la

estructura de un integrón con cassettes no relacionados necesariamente con resistencia a los antibióticos. En el paso de los integrones tipo 1 al ambiente clínico, los biocidas pudieron haber sido la presión selectiva, el cassette de *qac*, por tanto, la ventaja adaptativa para la posterior asociación con el transposon Tn 402 y su salto al ambiente humano. El gen *sul*, por su parte, ha sido hallado en diferentes ambientes como por ejemplo en suelos abonados (Heuer and Smalla 2007). Los integrones son introducidos por medio del abono por lo que éste constituye una fuente para la diseminación de genes de resistencia entre las bacterias del suelo. Las sulfonamidas fueron de los primeros antibióticos que se utilizaron para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Si los biocidas fueron la presión selectiva en el paso de los integrones tipo 1 al ambiente clínico, la asociación con el gen *sul* constituía sin lugar a dudas, la mejor ventaja en aquellos años y actualmente, donde todavía se usan las sulfonamidas.

La mayoría de los integrones localizados en los genomas completos y parciales analizados, estaban flanqueados por elementos que le confieren movilidad, como es el caso de las transposasas. También encontrábamos transposasas al lado de las integrasas halladas en los metagenomas del intestino humano, suelo y restos de ballena. Las transposasas son genes que potencialmente se transfieren más frecuentemente que otros (Wagner 2006). Igualmente están bajo presión selectiva para conservar su capacidad de moverse entre los diferentes organismos, tendiendo a ser eliminadas si ésta capacidad desaparece (Hooper *et al.* 2009). Hooper y colaboradores observaron además, que aquellos microorganismos que frecuentemente se mueven entre diferentes hábitats, como las bacterias patógenas, comparten transposasas con otros microorganismos de otros ambientes. La asociación de los integrones con transposasas u otros elementos de movilidad, es garantía para su transferencia y diseminación entre diferentes microorganismos y ambientes.

El conjunto de cassettes que encontramos en un ambiente y por tanto, a los que tiene acceso los integrones como elementos de captura de genes, podría estar determinado por las características propias del ambiente en cuestión. En un estudio en una planta de tratamiento de aguas residuales expuesta por más de un siglo a compuestos relacionados con la industria, observaron un enriquecimiento de cassettes involucrados en el catabolismo de compuestos procedentes de la industria (Koenig *et al.* 2009). El cassette más abundante hallado en la planta de tratamiento codificaba el regulador transcripcional LysR. Nosotros encontramos varios reguladores

transcripcionales situados al lado de las integrasas, cuando analizamos los metagenomas del intestino humano, suelo y restos de ballena. Entre ellos podemos destacar el regulador LuxR, involucrado en procesos de *quorum sensing*, bioluminiscencia y virulencia, entre otros. Algunas de las integrasas halladas se han encontrado ligadas a plásmidos conteniendo en su estructura secuencias de inserción, transposasas y cassettes involucrados en diferentes funciones celulares.

Un cassette importante de destacar, encontrado en el metagenoma de restos de ballenas, es un represor de la respuesta SOS flanqueando a una integrasa. Se ha visto que la respuesta SOS, aumenta la expresión de la integrasa, regulando la integración y excisión de cassettes en el integrón (Guerin *et al.* 2010). Otros factores buscando los mecanismos de regulación de los integrones están siendo investigados. Por ejemplo, en un estudio reciente se ha visto que procesos celulares como la replicación o la conjugación, pueden favorecer el correcto plegamiento del sitio *attC* y como consecuencia, regular de cierta forma, la recombinación en los integrones (Loot *et al.* 2010). Parece ser que el sustrato desencadenante de la regulación de los integrones, son las cadenas simples de DNA. Estos estudios confirmarían a los integrones como elementos implicados en la adaptación de las bacterias a diferentes estreses ambientales.

Diferentes métodos basados en programas bioinformáticos han sido desarrollados para analizar la transferencia horizontal de genes en un conjunto de secuencias. Este difícil trabajo resulta aún más complejo tratándose de metagenomas, donde encontramos una mezcla de secuencias, en general cortas, pertenecientes a una gran variedad de microorganismos. Un procedimiento propuesto para el análisis de secuencias de metagenomas evaluado con los metagenomas estudiados en esta tesis, demostró que el metagenoma de restos de ballena presentaba el mayor número de eventos de HGT, seguido del metagenoma del suelo y del intestino humano (Tamames and Moya 2008). Nosotros encontramos un mayor número de integrasas, de variedad de microorganismos y de posibles cassettes génicos en los metagenomas de restos de ballena y del suelo en comparación con el intestino humano, lo que apunta a que efectivamente los metagenomas de restos de ballena y suelo tengan un incremento en los eventos de HGT. Aunque existen muchos factores que influyen en la HGT que no podemos medir y que hasta desconocemos, los métodos bioinformáticos nos permiten analizar un gran cúmulo de datos y aportar respuestas a cuestiones impensables hace unos años atrás.

5.6. Genes de resistencia a antibióticos y biocidas en ambientes naturales extremos

Se han encontrado genes de resistencia a los antibióticos, como en nuestro caso, a los aminoglucósidos, en bacterias aisladas en el permafrost (capa congelada de suelo) de muestras recogidas en el Ártico (Mindlin *et al.* 2008). Los autores encuentran los genes *strA-strB* que codifican aminoglucósido fosfotransferasas y el gen *aadA* codificante de una aminoglucósido adeniltransferasa, usando los mismos antibióticos que nosotros para el *screening* de las genotecas.

Los biocidas se usan con mucha frecuencia en ámbitos doméstico y clínico así como para el control de la contaminación microbiana en las industrias y del *biofouling* (acumulación de algas, plantas, microorganismos, animales, etc.), en los cascos de los barcos, aparatos y elementos arquitectónicos sumergidos en el mar (Moore *et al.* 2008). Los biocidas tienen un amplio uso en la práctica clínica, mucho antes de la llegada de los antibióticos. Es por eso que se ha planteado la posibilidad de que la primera presión selectiva a nivel clínico, halla sido la resistencia a biocidas mediante el gen *qac*, presente en los integrones tipo 1 (Gillings *et al.* 2008; Gillings *et al.* 2009b). El incremento en la utilización de diferentes biocidas en la actualidad podría ser la pista para el hallazgo de nuevos elementos genéticos o nuevos genes posiblemente asociados con genes de resistencia a estos compuestos.

El fósforo resistente a triclosan fue hallado en la genoteca de Múrmansk. Este sitio es puerto de Rusia por lo que constituye un lugar contaminado por la mano del hombre en el que el uso de biocidas podría ser rutinario y por tanto, las bacterias estarían seleccionadas para resistir a la exposición de concentraciones de dichos biocidas. En el caso de este fósforo, no sabemos si la resistencia se debe al transportador ABC o a determinadas enzimas que puedan modificar el triclosan y por tanto, ser la causa del fenotipo de resistencia que observamos. En los últimos años se ha cuestionado la eficacia de determinados biocidas porque se ha visto que los biocidas seleccionan bacterias ambientales resistentes al propio biocida y también a otros compuestos entre los cuales están incluidos los antibióticos (McMurry *et al.* 1998; Schweizer 2001; McBain *et al.* 2002; Ledder *et al.* 2006). En nuestro laboratorio se ha visto que el triclosan selecciona a mutantes de *Stenotrophomonas maltophilia* a sobreexpresar la bomba de expulsión múltiple de drogas, SmeDEF (Sanchez *et al.* 2005). El transportador ABC o las enzimas

o ambos podrían ser los responsables de la resistencia a triclosan en este fósido.

Aunque no parece ser que las secuencias de los fósidos resistentes a triclosan, hexaclorofeno y amikacina-kanamicina se hallen dentro de una estructura que le permitiría movilidad, sí se han encontrado genes de resistencia a biocidas constituyendo cassettes dentro de la organización de integrones. En un plásmido de *Pseudomonas putida* (Park and Kim 2000) y en un transposon en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Davis *et al.* 2000; He *et al.* 2000) se ha localizado la enzima hidroxilaminobenzeno mutasa, que cataliza la reacción de reducción en el catabolismo de compuestos nitroaromáticos. Estos compuestos son utilizados en solventes y explosivos por lo que tener este cassette podría representar una ventaja o para el metabolismo o para la detoxificación.

Los genes en los fósidos resistentes a triclosan y hexaclorofeno presentaron altos porcentajes de homología y la misma sintenia que los genes presentes en *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* respectivamente, lo que nos sugiere que éstos microorganismos están en las muestras de las genotecas MMK (Múrmansk) y KB1 (fosa hipersalina MEDEE). En el caso del fósido resistente a amikacina-kanamicina, localizado también en la fosa hipersalina MEDEE, se encontró la misma distribución de los genes que en *Escherichia coli* con la diferencia de la inserción del gen *aph* de resistencia a aminoglucósidos.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. El sistema integrón/cassette genético está ampliamente distribuido en los ecosistemas naturales y por tanto podría contribuir significativamente a la diversidad y adaptabilidad de las bacterias en respuesta a cambios en la naturaleza.
2. La mayor parte de las secuencias de las integrón integrasas encontradas en ambientes contaminados, no contaminados y aislados de la actividad humana, son secuencias nuevas y presentan dominios comunes con integrasas ya descritas, en su mayoría bacterias que no han sido cultivadas. Por tanto, existe una gran variabilidad de integrones en estos habitats.
3. La gran cantidad de regiones centrales encontradas en los ambientes analizados nos permite pensar en la existencia de una gran variedad de combinaciones posibles en los integrones presentes en ambientes naturales.
4. En el ámbito clínico observamos una mayor especificidad de integrasas, sólo encontramos *int1* por lo que podemos decir que la variabilidad de integrasas en la microbiota humana es baja.
5. Los resultados de cuantificación de las integrasas en ambientes contaminados y no contaminados sugieren que existe un aumento en el número de integrasas en los ambientes contaminados en comparación con los ambientes no contaminados. Sin embargo, la variabilidad presente en las muestras no nos permite vincular inequívocamente el efecto de la contaminación con una mayor presencia de elementos implicados en HGT.
6. El paso de *int1* de los ecosistemas naturales al ambiente clínico puede justificarse por haber sido la primera en asociarse con determinantes de resistencia de modo que bajo presión selectiva se favoreciera su diseminación.
7. El análisis bioinformático nos permitió tener acceso a un gran número de secuencias anotadas actualmente en las bases de datos. El gran número de integrón integrasas y de posibles cassettes implicados en diversas funciones, en los metagenomas estudiados, se corresponden con los resultados hallados al analizar las muestras contaminadas, no contaminadas y aislada de la actividad humana.

Conclusiones

8. Las bombas de expulsión tipo ABC podrían estar involucradas en el fenotipo de resistencia a biocidas observado en los fósidos aislados de ambientes extremos. En el caso del fósido resistente a amikacina - kanamicina, la resistencia observada podría estar dada por la presencia del gen *aph*, de resistencia a aminoglucósidos.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Abbott, S. L. and J. M. Janda (1994) Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae* infection: report of two cases and review. *Clin Infect Dis.* **18**, 310-2.
- Abulencia, C. B., D. L. Wyborski, J. A. Garcia, M. Podar, W. Chen, S. H. Chang, H. W. Chang, D. Watson, E. L. Brodie, T. C. Hazen and M. Keller (2006) Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 3291-301.
- Adachi, H., M. Ishiguro, S. Imajoh, T. Ohta and H. Matsuzawa (1992) Active-site residues of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2 from *Escherichia coli*: similarity in catalytic mechanism to class A beta-lactamases. *Biochemistry.* **31**, 430-7.
- Aertsen, A. and C. W. Michiels (2006) Upstream of the SOS response: figure out the trigger. *Trends Microbiol.* **14**, 421-3.
- Ahmed, A. M., H. Nakano and T. Shimamoto (2005) Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother.* **55**, 371-4.
- Alekshun, M. N. and S. B. Levy (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* **128**, 1037-50.
- Alexander, E., A. Stock, H. W. Breiner, A. Behnke, J. Bunge, M. M. Yakimov and T. Stoeck (2009) Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environ Microbiol.* **11**, 360-81.
- Alonso, A., P. Sanchez and J. L. Martinez (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* **3**, 1-9.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**, 403-10.
- Allen, H. K., J. Donato, H. H. Wang, K. A. Cloud-Hansen, J. Davies and J. Handelsman (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* **8**, 251-9.
- Baquero, F. (2004) From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 510-8.
- Barkay, T. a. S., B.F (2005) Horizontal Gene Flow in Microbial Communities. *ASM.* **71**, 412-419.
- Barker, A. and P. A. Manning (1997) VlpA of *Vibrio cholerae* O1: the first bacterial member of the alpha 2-microglobulin lipocalin superfamily. *Microbiology.* **143 (Pt 6)**, 1805-13.
- Barlow, R. S. and K. S. Gobius (2006) Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J Antimicrob Chemother.* **58**, 1133-8.
- Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, C. Palm, M. C. Peck, R. Surzycki, D. H. Wells, K. C. Yeh, R. W. Davis, N. A. Federspiel and S. R. Long (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 9883-8.

- Beaber, J. W., B. Hochhut and M. K. Waldor (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*. **427**, 72-4.
- Benveniste, R. and J. Davies (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **70**, 2276-80.
- Berg, D. E., J. Davies, B. Allet and J. D. Rochaix (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72**, 3628-32.
- Binh, C. T., H. Heuer, M. Kaupenjohann and K. Smalla (2009) Diverse aadA gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. *Res Microbiol*. **160**, 427-33.
- Biskri, L., M. Bouvier, A. M. Guerout, S. Boisnard and D. Mazel (2005) Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. *J Bacteriol*. **187**, 1740-50.
- Biskri, L. and D. Mazel (2003) Erythromycin esterase gene ere(A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. **47**, 3326-31.
- Bissonnette, L. and P. H. Roy (1992) Characterization of $\text{In}0$ of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. **174**, 1248-57.
- Biyela, P. T., J. Lin and C. C. Bezuidenhout (2004) The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Sci Technol*. **50**, 45-50.
- Boucher, Y., M. Labbate, J. E. Koenig and H. W. Stokes (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*. **15**, 301-9.
- Boucher, Y., C. L. Nesbo, M. J. Joss, A. Robinson, B. C. Mabbutt, M. R. Gillings, W. F. Doolittle and H. W. Stokes (2006) Recovery and evolutionary analysis of complete integron gene cassette arrays from *Vibrio*. *BMC Evol Biol*. **6**, 3.
- Boyd, E. F., S. Almagro-Moreno and M. A. Parent (2009) Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol*. **17**, 47-53.
- Brandt, K. K., O. R. Sjöholm, K. A. Krogh, B. Halling-Sørensen and O. Nybroe (2009) Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environ Sci Technol*. **43**, 2963-8.
- Brown, H. J., H. W. Stokes and R. M. Hall (1996) The integrons $\text{In}0$, $\text{In}2$, and $\text{In}5$ are defective transposon derivatives. *J Bacteriol*. **178**, 4429-37.
- Cabello, F. C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*. **8**, 1137-44.
- Cambray, G., A. M. Guerout and D. Mazel (2010) Integrons. *Annu Rev Genet*.
- Clewell, D. B. a. G.-B., C. (1986) Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu. Rev. Microbiol*. **40**, 635-659.

- Collins, B., N. Curtis, P. D. Cotter, C. Hill and R. P. Ross (2010) The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**, 4416-23.
- Collis, C. M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H. W. Stokes and R. M. Hall (1993) Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* **9**, 41-52.
- Collis, C. M. and R. M. Hall (1992a) Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol.* **6**, 2875-85.
- Collis, C. M. and R. M. Hall (1992b) Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol.* **174**, 1574-85.
- Collis, C. M. and R. M. Hall (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 155-62.
- Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes and R. M. Hall (2002) Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol.* **184**, 3017-26.
- Coque, T. M. a. M. J. (2004) Antibiotic resistance genes in the environment. *Res. Adv. in Antimicrob. Agents and Chemother.* **4**, 1-9.
- Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo and A. Duarte (2003) Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 2838-43.
- Courvalin, P. (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**, 1447-51.
- Crespo, O., M. Catalano, S. Pineiro, M. Matteo, A. Leanza and D. Centron (2005) Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox. *Int J Antimicrob Agents.* **25**, 341-4.
- Chen, C. Y., K. M. Wu, Y. C. Chang, C. H. Chang, H. C. Tsai, T. L. Liao, Y. M. Liu, H. J. Chen, A. B. Shen, J. C. Li, T. L. Su, C. P. Shao, C. T. Lee, L. I. Hor and S. F. Tsai (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**, 2577-87.
- Chen, H., X. Tang, J. Lin, B. Zhang and D. Ren (2002) [Community constitute and phylogenetic analysis on soil uncultured microorganism]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **42**, 478-83.
- Datta, N., R. W. Hedges, E. J. Shaw, R. B. Sykes and M. H. Richmond (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **108**, 1244-9.
- Datta, N. and V. M. Hughes (1983) Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature.* **306**, 616-7.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* **264**, 375-82.
- Davis, J. K., G. C. Paoli, Z. He, L. J. Nadeau, C. C. Somerville and J. C. Spain (2000) Sequence analysis and initial characterization of two isozymes of

- hydroxylaminobenzene mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 2965-71.
- de la Cruz, F. and J. Davies (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 128-33.
- Elsaied, H., H. W. Stokes, T. Nakamura, K. Kitamura, H. Fuse and A. Maruyama (2007) Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol.* **9**, 2298-312.
- Erill, I., S. Campoy and J. Barbe (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev.* **31**, 637-56.
- Fajardo, A., N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, J. C. Galan, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tummmler, F. Baquero and J. L. Martinez (2008) The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One.* **3**, e1619.
- Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, V. A. Martins Dos Santos, M. M. Yakimov, K. N. Timmis and P. N. Golyshin (2005) Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chem Biol.* **12**, 895-904.
- Fluit, A. C. and F. J. Schmitz (2004) Resistance integrons and super-integrans. *Clin Microbiol Infect.* **10**, 272-88.
- Freijo, P. M. (2006) Integrones. Nueva causa de resistencia a antibióticos. *Editorial de la Rev. Esp. Quím.*, 1-4.
- Friedrich, M. W. (2002) Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J Bacteriol.* **184**, 278-89.
- Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers and A. Toussaint (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* **3**, 722-32.
- Gamielidien, J., A. Ptitsyn and W. Hide (2002) Eukaryotic genes in *Mycobacterium tuberculosis* could have a role in pathogenesis and immunomodulation. *Trends Genet.* **18**, 5-8.
- Ghosh, A., A. Singh, P. W. Ramteke and V. P. Singh (2000) Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem Biophys Res Commun.* **272**, 6-11.
- Gillings, M., Y. Boucher, M. Labbate, A. Holmes, S. Krishnan, M. Holley and H. W. Stokes (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol.* **190**, 5095-100.
- Gillings, M. R., M. P. Holley and H. W. Stokes (2009a) Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* **296**, 282-8.
- Gillings, M. R., D. Xuejun, S. A. Hardwick, M. P. Holley and H. W. Stokes (2009b) Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *Isme J.* **3**, 209-15.
- Glass, E. M., J. Wilkening, A. Wilke, D. Antonopoulos and F. Meyer Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb Protoc.* **2010**, pdb prot5368.

- Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella and R. Zemelman (1998) Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* **161**, 125-8.
- Gonzalez, J. M., M. C. Portillo and C. Saiz-Jimenez (2005) Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environ Microbiol.* **7**, 1024-8.
- Guerin, E., G. Cambray, S. Da Re, D. Mazel and M. C. Ploy (2010) [The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons]. *Med Sci (Paris)*. **26**, 28-30.
- Hall, B. G. and M. Barlow (2004) Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat.* **7**, 111-23.
- Hall, R. M., D. E. Brookes and H. W. Stokes (1991) Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol.* **5**, 1941-59.
- Hall, R. M. and H. W. Stokes (1993) Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica.* **90**, 115-32.
- Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier and P. H. Roy (2002) IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol.* **184**, 1712-21.
- Hardwick, S. A., H. W. Stokes, S. Findlay, M. Taylor and M. R. Gillings (2008) Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett.* **278**, 207-12.
- He, Z., L. J. Nadeau and J. C. Spain (2000) Characterization of hydroxylaminobenzene mutase from pNBZ139 cloned from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. A highly associated SDS-stable enzyme catalyzing an intramolecular transfer of hydroxy groups. *Eur J Biochem.* **267**, 1110-6.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter and C. M. Fraser (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* **406**, 477-83.
- Hentschel, U. and J. Hacker (2001) Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect.* **3**, 545-8.
- Heuer, H. and K. Smalla (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol.* **9**, 657-66.
- Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S. M. Faruque, R. Woodgate and M. K. Waldor (2001) Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constains. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 2991-3000.
- Holmes, A. J., M. R. Gillings, B. S. Nield, B. C. Mabbutt, K. M. Nevalainen and H. W. Stokes (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ Microbiol.* **5**, 383-94.

- Hooper, S. D., K. Mavromatis and N. C. Kyrpides (2009) Microbial co-habitation and lateral gene transfer: what transposases can tell us. *Genome Biol.* **10**, R45.
- Hughes, V. M. and N. Datta (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature.* **302**, 725-6.
- Igarashi, N., J. Harada, S. Nagashima, K. Matsuura, K. Shimada and K. V. Nagashima (2001) Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J Mol Evol.* **52**, 333-41.
- Isken, S. and J. A. de Bont (1996) Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol.* **178**, 6056-8.
- Isken, S., Santos, P.M. and de Bont, J.A. (1997) Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 642-647.
- Jacobs, L. and H. Y. Chenia (2007) Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol.* **114**, 295-306.
- Jordan, E., Saedler, H. and Starlinger, P. (1968) O^o and strong-polar mutations in the gal operon and insertions. *Mol. Gen. Genet.* **102**, 353-363.
- Kelley, W. L. (2006) Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol Microbiol.* **62**, 1228-38.
- Kim, Y. R., S. E. Lee, C. M. Kim, S. Y. Kim, E. K. Shin, D. H. Shin, S. S. Chung, H. E. Choy, A. Progulske-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield and J. H. Rhee (2003) Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect Immun.* **71**, 5461-71.
- Kimmitt, P. T., C. R. Harwood and M. R. Barer (1999) Induction of type 2 Shiga toxin synthesis in *Escherichia coli* O157 by 4-quinolones. *Lancet.* **353**, 1588-9.
- Koenig, J. E., Y. Boucher, R. L. Charlebois, C. Nesbo, O. Zhaxybayeva, E. Baptiste, M. Spencer, M. J. Joss, H. W. Stokes and W. F. Doolittle (2008) Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments. *Environ Microbiol.* **10**, 1024-38.
- Koenig, J. E., C. Sharp, M. Dlutek, B. Curtis, M. Joss, Y. Boucher and W. F. Doolittle (2009) Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PLoS One.* **4**, e5276.
- Kuan, C. T., S. K. Liu and I. Tessman (1991) Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in *Escherichia coli*. *Genetics.* **128**, 45-57.
- Labbate, M., R. J. Case and H. W. Stokes (2009) The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol Biol.* **532**, 103-25.
- Ledder, R. G., P. Gilbert, C. Willis and A. J. McBain (2006) Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. *J Appl Microbiol.* **100**, 1132-40.
- Lee, J. H., S. T. Yang, S. H. Rho, Y. J. Im, S. Y. Kim, Y. R. Kim, M. K. Kim, G. B. Kang, J. I. Kim, J. H. Rhee and S. H. Eom (2006) Crystal structure and functional studies reveal that PAS factor from *Vibrio vulnificus* is a novel member of the saposin-fold family. *J Mol Biol.* **355**, 491-500.

- Leverstein-Van Hall, M. A., A. Paauw, A. T. Box, H. E. Blok, J. Verhoef and A. C. Fluit (2002) Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol.* **40**, 3038-40.
- Levesque, C., S. Brassard, J. Lapointe and P. H. Roy (1994) Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene.* **142**, 49-54.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose and P. H. Roy (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 185-91.
- Levy, S. (2002) The Antibiotic Paradox: How Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers. *Perseus Cambridge.*
- Levy, S. B. and B. Marshall (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* **10**, S122-9.
- Liebert, C. A., R. M. Hall and A. O. Summers (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 507-22.
- Loot, C., D. Bikard, A. Rachlin and D. Mazel (2010) Cellular pathways controlling integron cassette site folding. *Embo J.* **29**, 2623-34.
- MacDonald, D., G. Demarre, M. Bouvier, D. Mazel and D. N. Gopaul (2006) Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature.* **440**, 1157-62.
- Machado, E., J. Ferreira, A. Novais, L. Peixe, R. Canton, F. Baquero and T. M. Coque (2007) Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother.* **51**, 2201-4.
- Maguire, A. J., D. F. Brown, J. J. Gray and U. Desselberger (2001) Rapid screening technique for class 1 integrons in Enterobacteriaceae and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 1022-9.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori and T. Iida (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet.* **361**, 743-9.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz F.J., Verhoef, J., Jones, M.E. (1999) Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**, 686-689.
- Martinez, E. and F. de la Cruz (1990) Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *Embo J.* **9**, 1275-81.
- Martinez, J. L. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* **321**, 365-7.
- Martinez, J. L., F. Baquero and D. I. Andersson (2007) Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* **5**, 958-65.
- Martinez, J. L., M. B. Sanchez, L. Martinez-Solano, A. Hernandez, L. Garmendia, A. Fajardo and C. Alvarez-Ortega (2009) Functional role of

- bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* **33**, 430-49.
- Mazel, D. (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* **4**, 608-20.
- Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb and J. Davies (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* **280**, 605-8.
- Mazodier, P. and J. Davies (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu Rev Genet.* **25**, 147-71.
- McBain, A. J., A. H. Rickard and P. Gilbert (2002) Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **29**, 326-30.
- McIver, C. J., P. A. White, L. A. Jones, T. Karagiannis, J. Harkness, D. Marriott and W. D. Rawlinson (2002) Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *J Clin Microbiol.* **40**, 1538-40.
- McLeod, M. P., R. L. Warren, W. W. Hsiao, N. Araki, M. Myhre, C. Fernandes, D. Miyazawa, W. Wong, A. L. Lillquist, D. Wang, M. Dosanjh, H. Hara, A. Petrescu, R. D. Morin, G. Yang, J. M. Stott, J. E. Schein, H. Shin, D. Smailus, A. S. Siddiqui, M. A. Marra, S. J. Jones, R. Holt, F. S. Brinkman, K. Miyauchi, M. Fukuda, J. E. Davies, W. W. Mohn and L. D. Eltis (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 15582-7.
- McMurry, L. M., M. Oethinger and S. B. Levy (1998) Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **166**, 305-9.
- Michael, C. A., M. R. Gillings, A. J. Holmes, L. Hughes, N. R. Andrew, M. P. Holley and H. W. Stokes (2004) Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *Am Nat.* **164**, 1-12.
- Mindlin, S. Z., V. S. Soina, M. A. Ptrova and M. Gorlenko Zh (2008) [Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from East Siberia permafrost sediments]. *Genetika.* **44**, 36-44.
- Mitsuhashi, S., K. Harada, H. Hashimoto, and R. Egawa. (1961) On the drug-resistance of enteric bacteria. *Jpn. J. Exp. Med.* **31**, 47-62.
- Moore, L. E., R. G. Ledder, P. Gilbert and A. J. McBain (2008) In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 4825-34.
- Moura, A., I. Henriques, K. Smalla and A. Correia (2010) Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol.* **161**, 58-66.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., Correia, A. (2007) Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **60(6)**, 1243-50.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P. (2001) Characterization of In53, a class 1 plasmid and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* **183**, 235-49.

- Nandi, S., J. J. Maurer, C. Hofacre and A. O. Summers (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 7118-22.
- Nemergut, D. R., A. P. Martin and S. K. Schmidt (2004) Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl Environ Microbiol*. **70**, 1160-8.
- Nesvera, J., J. Hochmannova and M. Patek (1998) An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*. **169**, 391-5.
- Nield, B. S., A. J. Holmes, M. R. Gillings, G. D. Recchia, B. C. Mabbutt, K. M. Nevalainen and H. W. Stokes (2001) Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett*. **195**, 59-65.
- Nunes-Duby, S. E., H. J. Kwon, R. S. Tirumalai, T. Ellenberger and A. Landy (1998) Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res*. **26**, 391-406.
- Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. **405**, 299-304.
- Ogawa, A. and T. Takeda (1993) The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats. *Microbiol Immunol*. **37**, 607-16.
- Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli and D. Centron (2002) Evolution of multiresistance in nontyphoid salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**, 3963-70.
- Paez-Espino, D., J. Tamames, V. de Lorenzo and D. Canovas (2009) Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*. **22**, 117-30.
- Park, H. S. and H. S. Kim (2000) Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J Bacteriol*. **182**, 573-80.
- Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera and J. R. Iredell (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. **33**, 757-84.
- Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Radstrom, L. Sundstrom, O. Skold, G. Swedberg and R. A. Skurray (1993) The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. **37**, 761-8.
- Piddock, L. J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. **4**, 629-36.
- Quiroga, M. P., P. Andres, A. Petroni, A. J. Soler Bistue, L. Guerriero, L. J. Vargas, A. Zorreguieta, M. Tokumoto, C. Quiroga, M. E. Tolmasky, M. Galas and D. Centron (2007) Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. **51**, 4466-70.
- Radstrom, P., O. Skold, G. Swedberg, J. Flensburg, P. H. Roy and L. Sundstrom (1994) Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol*. **176**, 3257-68.

- Ramirez, M. S., S. Pineiro and D. Centron (2010) Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**, 699-706.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran and A. Segura (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **56**, 743-68.
- Recchia, G. D. and R. M. Hall (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* **141** (Pt 12), 3015-27.
- Recchia, G. D., H. W. Stokes and R. M. Hall (1994) Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2071-8.
- Richmond, M. H. and R. B. Sykes (1972) The chromosomal integration of a -lactamase gene derived from the P-type R-factor RP1 in Escherichia coli. *Genet Res.* **20**, 231-7.
- Roberts, D. and N. Kleckner (1988) Tn10 transposition promotes RecA-dependent induction of a lambda prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 6037-41.
- Roberts, M. C. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 1-24.
- Robinson, A., Guilfoyle, A.P., Harrop, S.J., Boucher, Y., Stokes, H.W., Curmi, P.M., Mabbutt, B.C. (2007) A putative house-cleaning enzyme encoded within an integron array: 1.8 Å crystal structure defines a new MazG subtype. *Mol. Microbiol.* **66**, 610-621.
- Rodriguez, I., M. R. Rodicio, M. C. Mendoza and M. Cruz Martin (2006) Large conjugative plasmids from clinical strains of Salmonella enterica serovar virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**, 1603-7.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R. M. Goodman (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 2541-7.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, L. Biskri, P. Bouige and D. Mazel (2003) Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res.* **13**, 428-42.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout and D. Mazel (1999) Super-integrons. *Res Microbiol.* **150**, 641-51.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout and D. Mazel (2002) Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol.* **43**, 1657-69.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies and D. Mazel (2001) The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 652-7.
- Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol.* **292**, 115-25.

- Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne and C. Mabilat (1995) Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* **1**, 195-202.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York
- Sanchez, P., E. Moreno and J. L. Martinez (2005) The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 781-2.
- Sandvang, D., M. Diggle and D. J. Platt (2002) Translocation of integron-associated resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by Inc P and Inc W plasmids from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Microb Drug Resist.* **8**, 151-60.
- Sarmah, A. K., M. T. Meyer and A. B. Boxall (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* **65**, 725-59.
- Sass, A. M., B. A. McKew, H. Sass, J. Fichtel, K. N. Timmis and T. J. McGenity (2008) Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems.* **4**, 8.
- Sass, A. M., H. Sass, M. J. Coolen, H. Cypionka and J. Overmann (2001) Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl Environ Microbiol.* **67**, 5392-402.
- Schwartz, E., A. Henne, R. Cramm, T. Eitinger, B. Friedrich and G. Gottschalk (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol.* **332**, 369-83.
- Schweizer, H. P. (2001) Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* **202**, 1-7.
- Segura, P. A., M. Francois, C. Gagnon and S. Sauve (2009) Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ Health Perspect.* **117**, 675-84.
- Shapiro, J. A. (1969) Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **40**, 93-105.
- Shehabi, A. A., J. F. Odeh and M. Fayyad (2006) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from human stools and drinking water sources in Jordan. *J Chemother.* **18**, 468-72.
- Silby, M. W., A. M. Cerdano-Tarraga, G. S. Vernikos, S. R. Giddens, R. W. Jackson, G. M. Preston, X. X. Zhang, C. D. Moon, S. M. Gehrig, S. A. Godfrey, C. G. Knight, J. G. Malone, Z. Robinson, A. J. Spiers, S. Harris, G. L. Challis, A. M. Yaxley, D. Harris, K. Seeger, L. Murphy, S. Rutter, R. Squares, M. A. Quail, E. Saunders, K. Mavromatis, T. S. Brettin, S. D. Bentley, J. Hothersall, E. Stephens, C. M. Thomas, J. Parkhill, S. B. Levy, P. B. Rainey and N. R. Thomson (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* **10**, R51.
- Silver, S. and L. T. Phung (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.* **50**, 753-89.

- Sjolund, M., J. Bonnedahl, J. Hernandez, S. Bengtsson, G. Cederbrant, J. Pinhassi, G. Kahlmeter and B. Olsen (2008) Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerg Infect Dis.* **14**, 70-2.
- Smalla, K., A. S. Haines, K. Jones, E. Krogerrecklenfort, H. Heuer, M. Schlöter and C. M. Thomas (2006) Increased abundance of IncP-1beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 7253-9.
- Smalla, K. and P. A. Sobecky (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiol Ecol.* **42**, 165-75.
- Sorum, H., M. C. Roberts and J. H. Crosa (1992) Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**, 611-5.
- Stokes, H. W. and R. M. Hall (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* **3**, 1669-83.
- Stokes, H. W., A. J. Holmes, B. S. Nield, M. P. Holley, K. M. Nevalainen, B. C. Mabbutt and M. R. Gillings (2001) Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 5240-6.
- Stokes, H. W., C. L. Nesbo, M. Holley, M. I. Bahl, M. R. Gillings and Y. Boucher (2006) Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J Bacteriol.* **188**, 5722-30.
- Stokes, H. W., D. B. O'Gorman, G. D. Recchia, M. Parsekhian and R. M. Hall (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol.* **26**, 731-45.
- Streit, W. R. and R. A. Schmitz (2004) Metagenomics--the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* **7**, 492-8.
- Sullivan, J. T., S. D. Brown, R. R. Yocum and C. W. Ronson (2001) The bio operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiology.* **147**, 1315-22.
- Summers, A. O., J. Wireman, M. J. Vimy, F. L. Lorscheider, B. Marshall, S. B. Levy, S. Bennett and L. Billard (1993) Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**, 825-34.
- Sundstrom, L., P. H. Roy and O. Skold (1991) Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol.* **173**, 3025-8.
- Szczepanowski, R., S. Braun, V. Riedel, S. Schneiker, I. Krahn, A. Puhler and A. Schlöter (2005) The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology.* **151**, 1095-111.
- Tamames, J. and A. Moya (2008) Estimating the extent of horizontal gene transfer in metagenomic sequences. *BMC Genomics.* **9**, 136.

- Tauch, A., S. Gotker, A. Puhler, J. Kalinowski and G. Thierbach (2002) The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette aadA9 and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*. **48**, 117-29.
- Tennstedt, T., R. Szczepanowski, I. Krahn, A. Puhler and A. Schluter (2005) Sequence of the 68,869 bp IncP-1alpha plasmid pTB11 from a wastewater treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*. **53**, 218-38.
- Thiele-Bruhn, S. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soil - a review. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* **166**, 145-167.
- Timms-Wilson, T. M., L.S., Van Overbeek, M.J., Bailey, J.T. Trevors and J.D. Van Elsas. (2001) Quantification of gene transfer in soil and the rhizosphere. In: Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, DC., 648-659.
- Ubeda, C., E. Maiques, M. A. Tormo, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbe, R. P. Novick and J. R. Penades (2007) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol Microbiol.* **65**, 41-50.
- Utaker, J. B., K. Andersen, A. Aakra, B. Moen and I. F. Nes (2002) Phylogeny and functional expression of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the autotrophic ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira* sp. isolate 40KI. *J Bacteriol.* **184**, 468-78.
- Vaisvila, R., R. D. Morgan, J. Posfai and E. A. Raleigh (2001) Discovery and distribution of super-integrans among pseudomonads. *Mol Microbiol.* **42**, 587-601.
- van der Wielen, P. W. and S. K. Heijs (2007) Sulfate-reducing prokaryotic communities in two deep hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean deep sea. *Environ Microbiol.* **9**, 1335-40.
- van Elsas, J. D. and M. J. Bailey (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol.* **42**, 187-97.
- Van Elsas, J. D., Fry, J.C., Hirsch, P. and Molin, S. (2000) Ecology of plasmid transfer and spread. In: The Horizontal Gene Pool; Bacterial Plasmid and Gene Spread. Harwood Scientific Publishers, Amsterdam, 175-206.
- Van Elsas, J. D. a. B., M.J. (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology.* **42**, 187-197.
- Venter, J. C. (2006) Discovery in the dirt. *Nature*. **439**, 384-386.
- Verner-Jeffreys, D. W., T. J. Welch, T. Schwarz, M. J. Pond, M. J. Woodward, S. J. Haig, G. S. Rimmer, E. Roberts, V. Morrison and C. Baker-Austin (2009) High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS One*. **4**, e8388.
- Wagner, A. (2006) Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes. *Mol Biol Evol.* **23**, 723-33.
- Waldor, M. K. and D. I. Friedman (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.* **8**, 459-65.
- Watanabe, T. (1963) Infective heredity of multiple resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **27**, 87-115.

- Wright, M. S., C. Baker-Austin, A. H. Lindell, R. Stepanauskas, H. W. Stokes and J. V. McArthur (2008) Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *Isme J.* **2**, 417-28.
- Xu, H., J. Davies and V. Miao (2007a) Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol.* **189**, 6276-83.
- Xu, Z., L. Shi, C. Zhang, L. Zhang, X. Li, Y. Cao, L. Li and S. Yamasaki (2007b) Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clin Microbiol Infect.* **13**, 980-4.
- Yakimov, M. M., L. Giuliano, S. Cappello, R. Denaro and P. N. Golyshin (2007) Microbial community of a hydrothermal mud vent underneath the deep-sea anoxic brine lake Urania (eastern Mediterranean). *Orig Life Evol Biosph.* **37**, 177-88.

ÍNDICE DE TABLAS

8. Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades de los elementos genéticos implicados en HGT y en reclutamiento de genes.	27
Tabla 2. Muestras medioambientales.	53
Tabla 3. Características generales de las muestras de suelos contaminadas con arsénico.	54
Tabla 4. Muestras intestinales humanas.	55
Tabla 5. Cebadores de la PCR.	57
Tabla 6. Componentes de la PCR.	57
Tabla 7. Protocolos de las PCR.	58
Tabla 8. Antibióticos y biocidas utilizados en el estudio.	65
Tabla 9. Antibióticos utilizados para medir la susceptibilidad por difusión en disco.	68
Tabla 10. Integrasas en ambientes contaminados.	75
Tabla 11. Integrasas en ambientes no contaminados.	76
Tabla 12. Regiones centrales en ambientes contaminados.	78
Tabla 13. Regiones centrales en ambientes no contaminados.	83
Tabla 14. Integrasas amplificadas en la muestra Urania.	86
Tabla 15. Regiones centrales secuenciadas en Urania.	89
Tabla 16. Genes amplificados en las muestras intestinales humanas.	94
Tabla 17. Número de copias de los genes 16S e <i>int1</i> obtenidos para las muestras contaminadas y no contaminadas.	100
Tabla 18. Microorganismos con <i>int1</i>	102
Tabla 19. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en genomas completos y parciales.	103
Tabla 20. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas MG-RAST.	109
Tabla 21. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas CAMERA.	112
Tabla 22. Genes de la estructura de los integrones tipo 1 en la base de metagenomas IMG/M.	114

Tabla 23. Integrasas halladas en el metagenoma del intestino humano con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.	122
Tabla 24. Integrasas halladas en el metagenoma del suelo con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.	123
Tabla 25. Integrasas halladas en el metagenoma de restos de ballena con homologías con integrasas presentes en diferentes microorganismos.	125
Tabla 26. Posibles cassettes encontrados en los metagenomas: intestino humano, suelo y restos de ballenas.	129
Tabla 27. Concentración mínima inhibitoria de la cepa <i>E. coli</i> EPI300 a antibióticos y biocidas.	132
Tabla 28. Selección de clones resistentes en genotecas procedentes de ambientes extremos.	133
Tabla 29. Concentración mínima inhibitoria de los clones seleccionados.	134
Tabla 30. Leyenda de la Fig. 15. Estructura de los posibles integrones y entorno genético.	199
Tabla 31. Leyenda de la Fig. 20. Genes hipotéticos presentes en el fósforo resistente a triclosan.	200
Tabla 32. Leyenda de la Fig. 21. Genes hipotéticos presentes en el fósforo resistente a hexaclorofeno.	201
Tabla 33. Leyenda de la Fig. 22. Genes hipotéticos presentes en el fósforo resistente a kanamicina.	202

ÍNDICE DE FIGURAS

9. Índice de figuras

Fig. 1. Mecanismos mediante los cuales ocurre la HGT.	29
Fig. 2. Representación de la estructura y el funcionamiento de un integrón tipo 1.	32
Fig. 3. Representación de la estructura de un cassette génico.	37
Fig. 4. Localización geográfica de las muestras de suelos y la fosa marina Urania analizadas en el estudio.	54
Fig. 5. Representación esquemática del paso de pre-amplificación realizado en el estudio.	56
Fig. 6. Localización de los oligonucleótidos en el integrón.	57
Fig. 7. Localización de cada una de las muestras utilizadas para la construcción de las genotecas.	64
Fig. 8. Tipos de regiones centrales encontradas en los ambientes contaminados y no contaminados.	85
Fig. 9. Alineamiento de secuencias de proteínas en la muestra Urania.	87
Fig. 10. Árbol de identidades obtenido del alineamiento de proteínas en la muestra Urania.	88
Fig. 11. Tipos de regiones centrales amplificadas en la muestra Urania.	93
Fig. 12. Árbol de identidades de las integrasas obtenidas en todos los ambientes analizados.	96
Fig. 13. Amplificación de las regiones centrales en los ambientes contaminados con lindano y arsénico, no contaminados y la fosa Urania.	97
Fig. 14. Curvas de calibración obtenidas para los genes 16S e <i>int1</i>	99
Fig. 15. Estructura de los posibles integrones y entorno genético.	108
Fig. 16. Alineamiento de las integrón integrasas pertenecientes a bacterias no cultivadas encontradas en la red.	118
Fig. 17. Entornos genéticos diferentes encontrados en los metagenomas: intestino humano, suelo y restos de ballena.	127
Fig. 18. Clones con el fenotipo de resistencia comprobado.	138
Fig. 19. Electroforesis para los fósidos con fenotipo de resistencia.	139
Fig. 20. Genes presentes en el fósido resistente a triclosan.	140

Fig. 21. Genes hipotéticos presentes en el fósforo resistente a hexaclorofeno.	142
Fig. 22. Genes hipotéticos presentes en el fósforo resistente a amikacina. .	143

ANEXO I

10. Anexo I

Tabla 30. Leyenda de la Fig. 15. Estructura de los posibles integrones y entorno genético.

aadA = aminoglucósido adenililtransferasa
aaT = aminoglucósido acetiltransferasa
ABP= proteína de unión a ATP
AcoA = Acyl-CoA sintetasa
aphE = 3' estreptomina quinasa
Ase = ATPasa
bla = beta-lactamasa
CmlA = proteína de resistencia a cloranfenicol y florfenicol
CrT = ion transportador de cromato
dhfrI = dihidrofolate reductasa tipo I (proteína de resistencia a trimetoprim)
DT = metabolito de transporte/droga
FOL = dihidrofolate reductasa
fTn = fragmento de transposon
groE = chaperona GroEL
groS = chaperona GroS
GRP = proteína de resistencia a gentamicina
HK = histidina quinasa
HP = proteína hipotética
INT = integrasa
Int = integrasa
iPP = pirofosfatasa inorgánica
IS = secuencia de inserción
IstB = proteína de la transposición IstB para secuencia de inserción
MP = proteína de la membrana externa
NTP = proteína de unión a NTP
orf5 = paT = puromicina acetiltransferasa
OrfX = GCN5-relacionado con N-acetiltransferasa
per = permeasa
pRes = pseudo resolvasa
pSat = pseudo, fragmento de estreptotricina acetil-transferasa
qac = proteína de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio
R = recombinasa
Rec= RecF/N
Res = resolvasa
RP = proteína iniciadora de la replicación
sat = estreptotricina acetil-transferasa
SeSA = HAD-superfamilia, subfamilia IB hidrolasa
site = sitio-específico de la recombinasa
ST = transportador de sulfato
strB = proteína de resistencia a estreptomina
SUL = dihydropteroate sintasa
T = transposasa
tetA = proteína represora clase A, tetraciclina
tetR = proteína represora clase A, tetraciclina
Tn21 = resolvasa transposon Tn21
Tn21 = transposon Tn21

TniA = proteína TniA
tnpM = proteína moduladora de la transposición
topo = DNA topoisomerasa IV subunidad A
TR = regulador transcripcional

Tabla 31. Leyenda de la Fig. 20. Genes presentes en el fósforo resistente a triclosan.

Gen	Definición
<i>PFLU1619</i>	YP_002871260.1: putative decarboxylase, 99 % identidad.
<i>PFLU1620</i>	YP_002871261.1: hypothetical protein, 94 % identidad.
<i>PFLU1621</i>	YP_002871262.1: trans-2-enoyl-CoA reductase, 99 % identidad.
<i>PFLU1622</i>	YP_002871263.1: hypothetical protein, 94 % identidad.
<i>PFLU1623</i>	YP_002871264.1: putative LysR family regulatory protein, 90 % identidad.
<i>argD</i>	YP_002871265.1: acetylornithine aminotransferase, 94 % identidad.
<i>PFLU1629</i>	YP_002871270.1: putative peptidase, 95 % identidad.
<i>PFLU1630</i>	YP_002871271.1: putative LuxR family regulatory protein, 94 % identidad.
<i>PFLU1631</i>	YP_002871272.1: putative proline iminopeptidase, 86 % identidad.
<i>PFLU1632</i>	YP_002871273.1: putative peptide ABC transporter permease, 98 % identidad.
<i>PFLU1633</i>	YP_002871274.1: putative peptide ABC transporter permease, 94 % identidad.
<i>PFLU1634</i>	YP_002871275.1: putative peptide ABC transporter ATP-binding protein, 93 % identidad.
<i>PFLU1635</i>	YP_002871276.1: putative peptide ABC transporter ATP-binding protein, 91 % identidad.
<i>PFLU1636</i>	YP_002871277.1: putative peptide ABC transporter substrate-binding protein, 95 % identidad.
<i>PFLU1637</i>	YP_002871278.1: short chain dehydrogenase, 97 % identidad.
<i>PFLU1638</i>	YP_002871279.1: phosphoglycolate phosphatase, 96 % identidad.
<i>ubiG</i>	YP_002871280.1: 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase, 99 % identidad.
<i>PFLU1640</i>	YP_002871281.1: N-ethylmethylamine chlorohydrolase, 96 % identidad.
<i>mtnA</i>	YP_002871282.1: methylthioribose-1-phosphate isomerase, 83 % identidad
<i>gyrA</i>	YP_002871283.1: DNA gyrase subunit A, 94 % identidad.
<i>serC</i>	YP_002871284.1: phosphoserine aminotransferase, 97 % identidad.
<i>pheA</i>	YP_002871285.1: chorismate mutase/prephenate dehydratase, 100 % identidad.
<i>hisC</i>	YP_002871286.1: histidinol-phosphate aminotransferase, 94 %

	identidad.
<i>PFLU1647</i>	YP_002871287.1: bifunctional cyclohexadienyl dehydrogenase/ 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, 96 % identidad.
<i>cmk</i>	YP_002871288.1: cytidylate kinase, 98 % identidad.
<i>rpsA</i>	YP_002871289.1: 30S ribosomal protein S1, 98 % identidad.
<i>PFLU1650</i>	YP_002871290.1: putative lipoprotein, 93 % identidad.
<i>ihfB</i>	YP_002871291.1: integration host factor subunit beta, 100 % identidad.
<i>PFLU1652</i>	YP_002871292.1: hypothetical protein, 68 % identidad.

Tabla 32. Leyenda de la Fig. 21. Genes presentes en el fósforo resistente a hexaclorofeno.

Gen	Definición
<i>ybiH</i>	NP_415317.4: predicted DNA-binding transcriptional regulator, , 100 % identidad.
<i>ybhG</i>	NP_415316.1: predicted membrane fusion protein (MFP) component of efflux pump, membrane anchor, 100 % identidad.
<i>ybhF</i>	NP_415315.4: fused predicted transporter subunits of ABC superfamily: ATP-binding components, 100 % identidad.
<i>ybhS</i>	NP_415314.1: predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily, 100 % identidad.
<i>ybhR</i>	NP_415313.1: predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily, 99 % identidad.
<i>ybhQ</i>	NP_415312.1: inner membrane protein, 100 % identidad.
<i>ybhP</i>	NP_415311.1: conserved protein, endo/exonuclease/phosphatase family PFAM PF03372, 100 % identidad.
<i>ybhO</i>	NP_415310.1: cardiolipin synthase 2, 100 % identidad.
<i>ybhN</i>	NP_415309.1: conserved inner membrane protein, 94 % identidad.
<i>ybhM</i>	NP_415308.1: inner membrane protein, UPF0005 family, 100 % identidad.
<i>ybhL</i>	NP_415307.1: inner membrane protein, UPF0005 family, 100 % identidad.
<i>moaE</i>	NP_415306.1: molybdopterin synthase, large subunit, 100 % identidad.
<i>moaD</i>	NP_415305.1: molybdopterin synthase, small subunit, 100 % identidad.
<i>moaC</i>	NP_415304.1: molybdopterin biosynthesis, protein C, 100 % identidad.
<i>moaB</i>	NP_415303.1: molybdopterin biosynthesis protein B, 99 % identidad.
<i>moaA</i>	NP_415302.1: molybdopterin biosynthesis protein A, 99 % identidad.
<i>ybhK</i>	NP_415301.1: predicted transferase with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain, 100 % identidad.
<i>uvrB</i>	NP_415300.1: excinulease of nucleotide excision repair, DNA damage recognition component, 100 % identidad.
<i>bioD</i>	NP_415299.1: dethiobiotin synthetase, 98 % identidad.
<i>bioC</i>	NP_415298.1: malonyl-CoA methyltransferase, SAM-dependent, 99 % identidad.

<i>bioF</i>	NP_415297.1: 8-amino-7-oxononanoate synthase, 100 % identidad.
<i>bioB</i>	NP_415296.1: biotin synthase, 100 % identidad.
<i>bioA</i>	NP_415295.1: 7,8-diaminopelargonic acid synthase, PLP-dependent, 100 % identidad.
<i>ybhB</i>	NP_415294.1: kinase inhibitor homolog, UPF0098 family, 100 % identidad.

Tabla 33. Leyenda de la Fig. 22. Genes presentes en el fósforo resistente a amikacina.

Gen	Definición
<i>wcaI</i>	NP_288556.1: putative glycosyl transferase, 100 % identidad.
<i>fcl</i>	NP_416556.1: bifunctional GDP-fucose synthetase: GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose epimerase/ GDP-4-dehydro-6-L-deoxygalactose reductase, 100 % identidad.
<i>gmd</i>	NP_288557.1: GDP-mannose mannosyl hydrolase, 100 % identidad.
<i>wcaF</i>	NP_288560.1: putative colanic acid biosynthesis acetyltransferase WcaF, 100 % identidad.
<i>wcaE</i>	NP_288561.1: putative glycosyl transferase, 100 % identidad.
<i>wcaD</i>	NP_288562.1: putative colanic acid biosynthesis protein, 99 % identidad.
<i>wcaC</i>	P_288563.1: putative glycosyl transferase, 100 % identidad.
<i>wcaB</i>	NP_288564.1: putative colanic acid biosynthesis acetyltransferase WcaB, 100 % identidad.
<i>wcaA</i>	NP_288565.1: putative glycosyl transferase, 100 % identidad.
<i>Z3224</i>	NP_288566.2: tyrosine kinase, 99 % identidad.
<i>wzb</i>	NP_288567.1: tyrosine phosphatase, 100 % identidad.
<i>wza</i>	NP_288568.1: putative polysaccharide export protein, 100 % identidad.
<i>yegH</i>	NP_288569.1: putative transport protein, 100 % identidad.
<i>asmA</i>	NP_288572.2: putative assembly protein, 99 % identidad.
<i>dcd</i>	NP_288573.1: deoxycytidine triphosphate deaminase, 100 % identidad.
<i>udk</i>	NP_288574.2: uridine kinase, 100 % identidad.
<i>Z3235m</i>	NP_288575.1: putative sensor protein, 99 % identidad.
<i>aph</i>	NP_478145.1, aminoglycoside 3'-phosphotransferase (Km resistant gene) [Corynebacterium diphtheriae], 100 % identidad.
<i>yegE</i>	NP_416571.1, PAS domain sensory box containing diguanylate cyclase, GGDEF domain signaling protein, 96 % identidad.
<i>alkA</i>	NP_288576.1: 3-methyl-adenine DNA glycosylase II, 100 % identidad.
<i>yegD</i>	NP_288577.2: putative chaperone, 99 % identidad.
<i>wcaL</i>	NP_416548.1: predicted glycosyl transferase 100 % identidad.
<i>wcaK</i>	NP_416549.1: Colanic acid biosynthesis protein, 99 % identidad.
<i>wzxC</i>	NP_416550.1: predicted colanic acid exporter, 100 % identidad.
<i>wcaJ</i>	NP_416551.1: predicted UDP-glucose lipid carrier transferase, 99 %

	identidad.
<i>cpsG</i>	NP_416552.1: phosphomannomutase, 99 % identidad.
<i>cpsB</i>	NP_416553.1: mannose-1-phosphate guanylttransferase, 100 % identidad.

ANEXO II

11. Anexo II: Artículos publicados

Metagenomics and antibiotics

(Submitted in *Clinical Microbiology and Infection*)

Leonor Garmendia¹, Alvaro Hernandez², Maria B. Sanchez¹, Jose L. Martinez^{1, *}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, 28049-Madrid, and CIBERESP. Spain

²Division of Cancer Biology and Genetics, Queen's University Cancer Research Institute, Kingston, ON, Canada K7L 3N6.

*: Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain. Tel: +34-91-5854542; Fax: +34-91-5854506; e-mail:jlmtnez@cnb.csic.es

REVIEW ARTICLE

Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems

Jose Luis Martinez^{1,2}, María Blanca Sánchez^{1,2}, Laura Martínez-Solano^{1,2}, Alvaro Hernandez^{1,2}, Leonor Garmendia^{1,2}, Alicia Fajardo^{1,2} & Carolina Alvarez-Ortega^{1,2}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, Madrid, Spain; ²CIBERESP, Madrid, Spain

Correspondence: Jose Luis Martinez, Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. Tel.: +34 91 4854542; fax: +34 91 5854506; e-mail: jlmtnez@cnb.csic.es

Received 24 October 2008; revised 4 December 2008; accepted 4 December 2008.
First published online 16 January 2009.

DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x

Editor: Ramon Diaz Orejas

Keywords

multidrug efflux pumps; plant/bacteria interaction; quorum sensing; antibiotic resistance; MDR; bacterial ecology.

Abstract

Multidrug efflux pumps have emerged as relevant elements in the intrinsic and acquired antibiotic resistance of bacterial pathogens. In contrast with other antibiotic resistance genes that have been obtained by virulent bacteria through horizontal gene transfer, genes coding for multidrug efflux pumps are present in the chromosomes of all living organisms. In addition, these genes are highly conserved (all members of the same species contain the same efflux pumps) and their expression is tightly regulated. Together, these characteristics suggest that the main function of these systems is not resisting the antibiotics used in therapy and that they should have other roles relevant to the behavior of bacteria in their natural ecosystems. Among the potential roles, it has been demonstrated that efflux pumps are important for processes of detoxification of intracellular metabolites, bacterial virulence in both animal and plant hosts, cell homeostasis and intercellular signal trafficking.

Introduction

Efflux as a mechanism for antibiotic resistance was first described in 1980 (McMurry *et al.*, 1980). This seminal work demonstrated the presence of plasmid-encoded tetracycline efflux pumps in *Escherichia coli*. It was assumed that these antibiotic resistance determinants were likely acquired through horizontal gene transfer (HGT) from tetracycline producers, thus resembling classical antibiotic resistance genes (Benveniste & Davies, 1973; Davies, 1994, 1997). However, it soon became evident that antibiotic-efflux elements were neither exclusively plasmid encoded nor specific for a given antibiotic (George & Levy, 1983a,b). Genes encoding for these elements were found in the chromosome of other prokaryotes and also in the chromosomes of archaea and eukaryotes (Saier *et al.*, 1998; Paulsen *et al.*, 2001; Ninio & Schuldiner, 2003; Gbelska *et al.*, 2006; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008). For instance, a relevant role in the resistance of tumour cells to chemotherapy was established for the P-glycoprotein previously shown to be involved in colchicine resistance (Juliano & Ling, 1976;

Kartner *et al.*, 1983). Over the years, the contribution of antibiotic-efflux elements towards the antibiotic resistance exhibited by relevant bacterial pathogens has been highlighted in several studies (Li & Nikaido, 2004; Piddock, 2006b; Poole, 2007). Nevertheless, the main physiological function of multidrug resistance (MDR) pumps in natural bacterial populations is less well understood (Neyfakh, 1997).

MDR pumps differ from classical antibiotic resistance determinants in many aspects. As mentioned above, the general assumption has been that antibiotic resistance genes originate in antibiotic-producing organisms (Benveniste & Davies, 1973; Pang *et al.*, 1994) and that they spread to bacteria through HGT as a result of the selective pressure exerted by the intensive use of antibiotics against pathogens (Pang *et al.*, 1994; Davies, 1997; D'Acosta *et al.*, 2006; Wright, 2007). In contrast, we now know that the presence of MDR pumps is not restricted to antibiotic producers. In the case of bacteria, most of the genes coding for MDR pumps analyzed so far are found within the chromosome and exhibit a conserved structure and arrangement (Fig. 1) as well as a tightly regulated expression (Grkovic *et al.*,

A global view of antibiotic resistance

Jose Luis Martinez^{1,2}, Alicia Fajardo^{1,2}, Leonor Garmendia^{1,2}, Alvaro Hernandez^{1,2}, Juan Francisco Linares^{1,2}, Laura Martínez-Solano^{1,2} & María Blanca Sánchez^{1,2}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, Madrid, Spain; and ²CIBERESP, Spain

Correspondence: Jose Luis Martinez, Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain. Tel.: +34 915854542; fax: +34 915854506; e-mail: jlmtnez@cnb.csic.es

Present address: Juan Francisco Linares, Department of Molecular Oncogenesis, Genome Research Institute, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45229, USA.

Received 3 July 2008; revised 10 October 2008; accepted 10 October 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x

Editor: Victor de Lorenzo

Keywords

antibiotic resistance; bacterial evolution; fitness cost; hypermutation; horizontal gene transfer; HGT.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the few examples of evolution that can be addressed experimentally. The present review analyses this resistance, focusing on the networks that regulate its acquisition and its effect on bacterial physiology. It is widely accepted that antibiotics and antibiotic resistance genes play fundamental ecological roles – as weapons and shields, respectively – in shaping the structures of microbial communities. Although this Darwinian view of the role of antibiotics is still valid, recent work indicates that antibiotics and resistance mechanisms may play other ecological roles and strongly influence bacterial physiology. The expression of antibiotic resistance determinants must therefore be tightly regulated and their activity forms part of global metabolic networks. In addition, certain bacterial modes of life can trigger transient phenotypic antibiotic resistance under some circumstances. Understanding resistance thus requires the analysis of the regulatory networks controlling bacterial evolvability, the physiological webs affected and the metabolic rewiring it incurs.

Introduction

Bacterial pathogens, once susceptible to antimicrobial agents, are becoming increasingly resistant. In addition, hospitals are now facing problems caused by new opportunistic pathogens (from nonclinical environments) that show little susceptibility to antibiotics (Quinn, 1998; Gaynes & Edwards, 2005). Increasing antibiotic resistance poses important risks to human health (Cohen, 1992; Levy, 1998; Levy & Marshall, 2004); it can affect the course of infectious disease (World Health Organization, 1999) and increase the danger associated with immunosuppression (e.g. in transplantation and anticancer chemotherapy), intubation, catheterization and other common procedures, all of which rely on antibiotics to overcome the infections with which they are commonly associated. As stated by the World Health Organization, the spread of antibiotic-resistant bacteria at hospitals ‘means that commonplace medical

procedures once previously taken for granted could be conceivably consigned to medical limbo. The repercussions are almost unimaginable’ (World Health Organization, 2000).

Nonetheless, antibiotic resistance is one of the few examples of evolution that can be studied in real time (Martinez *et al.*, 2007; Courvalin, 2008); this is the focus of the present review [the danger to health and the basic mechanisms of resistance have been reviewed elsewhere (Cohen, 1992; Levy, 1998; Levy & Marshall, 2004)]. This paper does not, therefore, use the clinical definition of resistance based on minimal inhibitory concentration breakpoints (Turnidge & Paterson, 2007), but rather adopts the wider view that it is represented by any mechanism that reduces susceptibility to antibiotics. Antibiotic resistance can come about either as the consequence of genetic change (mutations) (Martinez & Baquero, 2000) or by the acquisition of antibiotic resistance genes (Davies, 1997) through